

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CASEC14: UN GEN
IMPLICADO EN LA RUTA DE SECRECCIÓN DE PROTEÍNAS EN
“CANDIDA ALBICANS”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Lucía Monteoliva Díaz

Bajo la dirección de los doctores

César Nombela Cano
Concepción Gil García

Madrid, 1997

ISBN: 84-669-2418-3

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II**

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *CaSEC14*,
UN GEN IMPLICADO EN LA RUTA DE SECRECIÓN
DE PROTEÍNAS EN *Candida albicans***

Memoria presentada para optar al grado de doctor en Farmacia por

LUCÍA MONTEOLIVA DÍAZ

Directores:

**DR. D. CÉSAR NOMBELA CANO
DRA. D^a CONCEPCIÓN GIL GARCÍA**

Madrid, mayo de 1997

DON RAFAEL ROTGER ANGLADA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA: Que D^a Lucía Monteoliva Díaz ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la doctora D^a Concepción Gil García y del doctor D. César Nombela Cano, el trabajo que presenta para optar al grado de doctora en Farmacia bajo el título: “CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *CaSEC14*, UN GEN IMPLICADO EN LA RUTA DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN *Candida albicans*”.

Y, para que conste, firmo la presente certificación en Madrid, a 27 de mayo de 1997.

Firmado: D. Rafael Rotger Anglada

Quiero dedicar este trabajo a:

**Mi familia
Nacho**

El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

-La retribución personal a cargo del proyecto: "Nuevos planteamientos para el desarrollo de antifúngicos capaces de interferir con funciones propias de la pared celular de los hongos patógenos para el hombre" financiado por Glaxo España, S.A. (marzo de 1992-marzo de 1993).

-Una Beca predoctoral para la realización de la Tesis Doctoral otorgada por la Universidad Complutense de Madrid (abril de 1993-diciembre de 1996).

-El proyecto de investigación: "Caracterización de genes de *C. albicans* como base para el análisis del dimorfismo, sus implicaciones en la patogenicidad y la mejora de los métodos diagnósticos" financiado por el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social (FIS93/0183).

-El proyecto de investigación: "Aislamiento e identificación de genes de *Candida albicans* implicados en el dimorfismo y la resistencia a antifúngicos" concedido por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Secretaría General del Plan Nacional de I+D (SAF 96-1540) en julio de 1995.

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración y apoyo de un gran número de personas, tanto del Departamento como ajenas a él.

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento al profesor César Nombela, que, al permitir mi incorporación en su grupo de investigación, contribuyó a que pudiera llevar a la práctica mi ilusión de trabajar en el campo de la manipulación genética. Desearía agradecer también su apoyo al trabajo que he realizado durante estos años.

A Concha debo reconocerle no solo el tiempo empleado en enseñarme y dirigirme y el entusiasmo demostrado en todos los trabajos en los que he intervenido sino, además, su constante ánimo y sus consejos (sobre lo científico y sobre lo humano). Asimismo quiero agradecerle a Jesús el tiempo (que no tiene) dedicado a resolver todos los problemas que me han surgido en el laboratorio y a buscar nuevas ideas encaminadas a conseguir una calidad científica adecuada. A los dos, muchas gracias, de una manera muy especial, por la preocupación personal que han demostrado por mi futuro científico.

De Miguel Sánchez no puedo olvidar, entre otras muchísimas cosas, el haber sido el impulsor de la idea que se ha concretado en esta Tesis Doctoral; y a María Molina y a Rafael Rotger el estar siempre dispuestos para atender cualquier tipo de consulta.

A mis amigos, antes que compañeros, del piso de abajo no les debo agradecimiento solamente en el ámbito científico, sino también en el personal: Fede, vecino de poyata durante tantos años, me ha echado una mano en innumerables ocasiones y, muchas de ellas, sin necesidad ni siquiera de pedírselo; Rosita que, a pesar de que se ha cambiado de cuarto, continuamente tenemos su huella en el material de trabajo que ha construido y que nos es de gran utilidad; Carmen, con su gran orden y sus conocimientos únicos sobre todo tipo de cuestiones de supervivencia; M^a Luisa, que hace de fumarse un cigarro una agradable reunión de amigos o, si es necesario, de trabajo; Ana, con su forma envidiable de ver la vida y con la que he podido colaborar en su trabajo; Mar, con la que he compartido penas cuando trabajábamos las dos con proteínas y durante la escritura de la Tesis, y que alegra cualquier momento con una facilidad increíble; Rebeca, siempre de aspecto tranquilo y con palabras agradables y, Christine, la más internacional del laboratorio que además de derrochadora de simpatía lo es de cookies. A todos ellos agradecerles, sobre todo, las charlas, los cafés y las meriendas, con gusanitos y cotilleo incluido, que nos han dado las fuerzas para seguir trabajando hasta horas, en algunos casos, indecentes.

También quiero incluir aquí a personas que, aunque se hayan marchado, nos han dejado un granito de arena muy especial en ese piso de abajo: Lola, Sonia, Alberto, Rosa Clemente y Ale. Tampoco quiero olvidarme de Sao y de Marta, que espero que hayan aprendido lo que necesitaban durante su estancia en el laboratorio.

Entre las *Candidas* del piso de arriba están Inma Rios y Aída y, como no, las *Candidas* con más ratones: Rosalía y Gloria y, con ellas, Maite, Rosa Cenamor y Mariví, todas geniales para una tertulia de cualquier tipo.

Mucho me han ayudado también desde la Unidad de Secuenciación. Gracias a Maribel y Javier. No olvido tampoco a la Unidad de Citometría. A Alberto y a Amalia a quien, además de su indiscutible amabilidad y simpatía andaluzas, todos los del laboratorio le debemos el tiempo que ha dedicado a proveernos de todo lo necesario.

De la Unidad 3, en primer lugar, destacar al incansable trabajador, Víctor. Para él, se me ocurre el calificativo de genial, además de simpático, brillante, etc. Junto con él está Humberto, con su carácter tranquilo y amigable. Quiero mencionar especialmente a Mercedes, que con su trabajo está dando utilidad a muchas de las horas invertidas en mis

primeros tiempos en el laboratorio y, además, siempre con una sonrisa. También se encuentran en esa unidad Javier Jiménez, Chema e Inma Cosano. Un saludo (muy lejano) a Pablo al que me une, entre otras cosas, la *terra* y, como no, a María Soler, Esme, Antonia y María Yuste.

De Bacterias, mencionar especialmente a José Manuel, con quien, desde luego, no puedes aburrirte. También dar gracias a M^a Ángeles, Isabel, Mada, Miguelín y Javier Regidor.

No quiero tampoco dejar de expresar mi agradecimiento a otras profesoras de esta casa que siempre han atendido, sin dudar, todas las consultas que les he hecho: Angelines, Carmen de la Rosa, Conchita Pintado y Carmina.

Además quería destacar la colaboración y ayuda de otras personas muy necesarias para nuestro trabajo: Benito, alegría de las mañanas; Rosi, con su conversación y elogios constantes; José Alberto, Elena, Marga y Paloma y, en fin, todo el resto de personas que forman parte del Departamento y que no he mencionado todavía.

Otras muchas personas que han estado en distintos momentos en el Departamento y también, a todas ellas, expresar mi agradecimiento. Entre éstas a Susana, Melba, Alicia, Cristina, Lupe, Concha, Jesús y Alfonso.

Desde fuera del Departamento también he recibido mucho apoyo que no quería dejar de agradecer. En primer lugar a mi tío Alberto que desde siempre me ha ido aconsejando en los pasos a seguir para llegar al mundo científico que me interesaba. También quiero agradecer el apoyo incondicional de toda mi familia (padres, hermanos, cuñados, sobrinos...), así como de muchos y muy buenos amigos. Todos ellos me han animado en esos momentos (más frecuentes de lo uno espera) en que los experimentos deciden que no van a darle a uno más que dolores de cabeza. Agradecer, cómo no, a Nacho, aparte de muchas otras cosas, la paciencia demostrada en estos meses de escritura y alguna que otra sugerencia en materia de redacción u ortografía. Por último, agradecer, por qué no, a Churriña su compañía constante mientras escribía, e incluso, sus inoportunas interrupciones que me obligaban, aunque sólo fuera por un momento, a separar la vista del ordenador.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	9
1. <i>Candida albicans</i>.....	9
1.1. Características biológicas.....	9
1.1.1. Características generales.....	9
1.1.2. Transición dimórfica.....	10
1.1.3. Genética de <i>C. albicans</i> y herramientas para su manipulación.....	13
1.2. Importancia clínica: candidiasis.....	15
1.2.1. Infecciones producidas por <i>C. albicans</i>	15
1.2.1.1. Candidiasis superficiales.....	16
1.2.1.2. Candidiasis sistémicas.....	17
1.2.2. Factores de virulencia.....	18
1.3. Tratamientos actuales y desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos.....	19
1.3.1. Características del antifúngico ideal.....	19
1.3.2. Antifúngicos actuales.....	19
1.3.2.1. Anfotericina B y nistatina.....	19
1.3.2.2. 5-fluorocitosina.....	20
1.3.2.3. Azoles: fármacos imidazólicos y triazólicos.....	20
1.3.2.4. Otros antifúngicos.....	21
1.3.3. Antifúngicos en desarrollo.....	21
1.3.4. Estrategias de búsqueda de nuevos antifúngicos.....	22
2. RUTA DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS.....	24
2.1. Mutantes de levadura en la ruta de secreción.....	24
2.2. Flujo de proteínas a través de la ruta.....	25
2.3. Distintos pasos de la ruta de secreción.....	27
2.3.1. Translocación de las proteínas al retículo endoplásmico y modificaciones sufridas en éste.....	27
2.3.2. Movimiento desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi. Mecanismo de emergencia y fusión de vesículas.....	28
2.3.3. Paso de las proteínas a través del aparato de Golgi y su clasificación hacia distintas localizaciones finales.....	32
2.3.4. Fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática: exocitosis.....	33
2.4. Genes descritos de <i>C. albicans</i> relacionados con la secreción.....	34
2.5. Secreción constitutiva y regulada en mamíferos.....	35
3. PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE FOSFATIDILINOSITOL.....	35
3.1. Gen <i>SEC14</i> y proteína Sec14p de <i>S. cerevisiae</i>	35
3.1.1. Clonación y características del gen <i>SEC14</i> y de Sec14p.....	35
3.1.2. Función de la proteína Sec14p: actividad bioquímica y posibles papeles fisiológicos.....	36
3.1.2.1. Funciones atribuidas a Sec14p en relación a su actividad <i>in vitro</i>	37
3.1.2.2. Mutaciones supresoras de la mutación <i>sec14^{ts}</i> en <i>S. cerevisiae</i>	38
3.1.2.3. Modelo de actuación de Sec14p <i>in vivo</i>	41
3.1.2.4. Distintas funciones celulares en las que se ha implicado a Sec14p.....	43
3.1.3. Genes homólogos a <i>SEC14</i> en otras levaduras.....	44

3.2. Proteínas de transferencia de fosfatidilinositol en mamíferos.....	45
3.2.1. Actividad, distribución y conservación.....	45
3.2.2. Caracterización de las PITPs de diferentes especies de mamíferos.....	47
3.2.2.1. Proteínas de transferencia de fosfatidilinositol de rata.....	47
3.2.2.2. Proteínas humanas de transferencia de fosfatidilinositol.....	48
3.2.3. Funciones celulares en las que se ha implicado a las PIPs de mamíferos.....	48
3.2.3.1. Implicación de las PIPs en proceso de cebado de los gránulos de la secreción regulada.....	49
3.2.3.2. Implicación de las PIPs en la formación de vesículas de la secreción constitutiva y gránulos de la secreción regulada a partir del <i>trans</i> -Golgi.....	50
3.2.3.3. Implicación de las PIPs en las rutas de transducción de señales.....	50
3.3. Modelo general del mecanismo de formación de vesículas a partir del aparato de Golgi: intervención de las PIPs y Sec14p.....	53
3.4. Otras proteínas relacionadas con Sec14p o con las PIPs.....	54
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. CEPAS.....	59
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	60
2.1. <i>S. cerevisiae</i>	60
2.2. <i>C. albicans</i>	61
2.3. <i>E. coli</i>	61
3. ENSAYOS DE DE FILAMENTACIÓN.....	62
4. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.....	62
4.1. Determinación de fosfatasa alcalina en medio sólido.....	62
4.2. Determinación de actividad exoglucanasa en medio sólido.....	62
4.3. Determinación de fosfatasa ácida en medio sólido.....	63
5. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA Y PROTEÍNAS.....	63
5.1. Plásmidos.....	63
5.2. Genotecas.....	65
5.3. Transformación de DNA.....	66
5.4. Secuenciación de DNA y análisis de las secuencias.....	66
5.5. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.....	67
5.6. Extracción de DNA de levaduras.....	67
5.7. Hibridación DNA-DNA.....	68
5.8. Electroforesis de campo pulsante y localización cromosómica.....	68
5.9. Western blot.....	68
5.10. Mutagénesis dirigida.....	69
5.11. Análisis de fragmentos pequeños de DNA en geles de poliacrilamida.....	69
6. INTERRUPCIÓN DE GENES DE <i>C. albicans</i>	69
7. EXPERIMENTOS DE INTERCAMBIO DE PLÁSMIDOS.....	70
8. SEGREGACIÓN MEIÓTICA.....	70
RESULTADOS	71
1. CLONACIÓN DE GENES DE <i>C. albicans</i> QUE COMPLEMENTAN LA MUTACIÓN <i>sec14^{ts}</i> DE <i>S. cerevisiae</i>	71
1.1. Estudio de las características fenotípicas del mutante CTY1-1A de <i>S. cerevisiae</i>	71

1.2. Condiciones de electroporación.....	72
1.3. Rastreo del mutante CTY1-1A con una genoteca de <i>C. albicans</i> . Clonación de pLM1, pLM13, pLM15 y pLM19.....	72
2. CaSEC14: CARACTERIZACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ESTUDIO FUNCIONAL.....	74
2.1. Mapa de restricción y estudio la complementación de diversos fragmentos del inserto de pLM1.....	74
2.2. CaSEC14 proviene del genoma de <i>C. albicans</i>	75
2.3. Detección de un gen homólogo a CaSEC14 en el genoma de <i>C. albicans</i>	76
2.4. CaSEC14 en monocopia complementa la mutación <i>sec14</i> termosensible de <i>S. cerevisiae</i>	77
2.5. Secuenciación y análisis de la secuencia.....	77
2.5.1. Características de la secuencia de nucleótidos.....	77
2.5.2. Características de la secuencia de aminoácidos.....	80
2.6. Dispensabilidad del extremo carboxiterminal.....	82
2.7. CaSEC14 en multicopia puede sustituir a la función de SEC14 en <i>S. cerevisiae</i>	82
2.8. Localización cromosómica del gen CaSEC14.....	83
2.9. Deleción del gen CaSEC14 en <i>C. albicans</i>	83
2.9.1. Interrupción de un alelo del gen.....	86
2.9.2. Transformación para la deleción del segundo alelo de CaSEC14.....	86
2.9.3. Análisis fenotípico de las cepas de <i>C. albicans</i> con un alelo de CaSEC14 delecionado.....	89
2.10. Construcción de un mutante de <i>C. albicans sec14^{ts}</i>	91
2.10.1. Construcción de plásmidos con distintos alelos mutantes.....	91
2.10.2. Comprobación de la termosensibilidad de <i>Cassec14-1</i> y <i>Cassec14-7</i> en <i>S. cerevisiae</i>	93
2.10.3. Introducción de los genes mutados en <i>C. albicans</i> CNC21 y expulsión del marcador.....	95
2.10.4. Estudio de distintos clones termosensibles.....	99
2.10.5. Búsqueda mediante PCR de clones que porten en su genoma los alelos termosensibles <i>Cassec14-1</i> y <i>Cassec14-7</i>	101
2.10.6. Análisis fenotípico y genotípico de <i>C. albicans</i> "2.179".....	103
2.11. Análisis de la proteína CaSec14p en <i>C. albicans</i> y <i>S. cerevisiae</i>	106
3. PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE FOSFATIDILINOSITOL Y FOSFATIDILCOLINA HUMANAS.....	108
3.1. Construcción de plásmidos que codifican las proteínas humanas PITP α y PITP β	108
3.2. Capacidad de las proteínas PITP α y PITP β humanas de complementar mutantes de <i>S. cerevisiae</i> en el gen SEC14.....	110
3.2.1. Complementación de un mutante <i>sec14^{ts}</i> de <i>S. cerevisiae</i>	110
3.2.2. Las PITPs humanas pueden sustituir la función de Sec14p en <i>S. cerevisiae</i>	111
DISCUSIÓN	113
1. INTERÉS DE LA CLONACIÓN DE CASEC14.....	113
2. CASEC14 ES UN GEN ESENCIAL.....	114
2.1. Datos que apoyan esta afirmación.....	114
2.2. Obtención de alelos y mutantes termosensibles.....	116
2.3. Nuevas estrategias para comprobar la esencialidad de distintos genes de <i>C. albicans</i> ...	118
3. CaSec14p ES LA PROTEÍNA DE <i>C. albicans</i> HOMÓLOGA A Sec14p DE <i>S. cerevisiae</i>...120	120
4. LAS PITPs HUMANAS CUMPLEN LA FUNCIÓN DE Sec14p EN <i>S. cerevisiae</i>.....	122
5. CaSec14p COMO DIANA PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS Y SELECTIVOS AGENTES ANTIFÚNGICOS.....	124

CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXO	145

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Células de <i>C. albicans</i> con distintas morfologías.....	10
Tabla I. Factores que predisponen a la aparición de los distintos tipos de infecciones producidas por <i>C. albicans</i>	16
Figura 2. Flujo de vesículas que transportan proteínas a través de la ruta de secreción.....	26
Tabla II. Características principales de las vesículas de transporte tipo COPI y COPII.....	29
Figura 3. Distintos pasos del mecanismo molecular general de la emergencia y fusión de vesículas transportadoras de proteínas de tipo COPI entre distintos compartimentos de la ruta de secreción.....	30
Figura 4. Conservación del mecanismo de fusión de vesículas en distintos pasos de la ruta de secreción de proteínas en levaduras.....	31
Figura 5. Rutas de síntesis de fosfatidilcolina (PC) en <i>S. cerevisiae</i> : síntesis <i>de novo</i> y ruta de la CDP-colina o Kennedy.....	39
Figura 6. Modelos de actuación de Bsd2p.....	40
Figura 7. Modelo del mecanismo de actuación de Sec14p.....	42
Tabla III. Características de distintas proteínas de transferencia de fosfatidilinositol y fosfatidilcolina de mamíferos.....	46
Figura 8. Funciones de las PITPs en mamíferos.....	49
Figura 9. A) Síntesis de PIP ₂ a partir del PI presentado por la PITP. B) Modelo de actuación de la fosfolipasa C- β en la transducción de señales captadas a través de un receptor transmembranal asociado a una proteína G.....	52
Figura 10. Modelo general de formación de vesículas de secreción en las membranas del aparato de Golgi.....	54
Tabla IV. Cepas utilizadas en este trabajo.....	59
Tabla V. Cepas obtenidas en este trabajo.....	60
Tabla VI. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	64
Tabla VII. Plásmidos obtenidos durante la realización de este trabajo.....	64
Tabla VIII. Oligonucleótidos utilizados en secuenciación y PCR.....	66
Figura 11. Análisis de restricción de los distintos plásmidos aislados de la genoteca de <i>C. albicans</i> 1001 y que complementan el defecto de crecimiento a 37°C del mutante CTY1-1A: pLM1, pLM13, pLM15 y pLM19.....	73
Figura 12. Mapa de restricción del locus <i>CaSEC14</i> y estudio de la capacidad de distintos subfragmentos de éste de complementar el fenotipo termosensible de la cepa CTY1-1A.....	74
Figura 13. <i>CaSEC14</i> proviene del genoma de <i>C. albicans</i> . Análisis por Southern blot....	75
Figura 14. Detección de un gen homólogo a <i>CaSEC14</i> en el genoma de <i>C. albicans</i>	76
Figura 15. Secuencia nucleotídica del gen <i>CaSEC14</i> y secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica.....	78
Figura 16. Alineamiento de proteínas Sec14p de distintas levaduras y proteínas relacionadas.....	79
Figura 17. Dendrograma del alineamiento de proteínas Sec14p de distintos organismos y de proteínas relacionadas.....	80
Figura 18. Índice hidropático de <i>CaSec14p</i>	81
Figura 19. Localización cromosómica de <i>CaSEC14</i>	83
Figura 20. Estrategia de interrupción que teóricamente valdría para ambos alelos del locus <i>CaSEC14</i>	85

Figura 21. Esquema de interrupción de <i>CaSEC14</i> y análisis de las cepas con un alelo interrumpido mediante: A) PCR y B) Southern blot.....	87
Figura 22. Análisis mediante Southern blot de algunos de los transformantes obtenidos en la transformación para la interrupción del segundo alelo de <i>CaSEC14</i>	88
Figura 23. Análisis cariotípico de las cepas de <i>C. albicans</i> con un alelo de <i>CaSEC14</i> interrumpido.....	90
Figura 24. Hibridación de los oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis dirigida con la secuencia de <i>CaSEC14</i>	92
Figura 25. Secuencias de los alelos mutantes.....	92
Figura 26. Construcción de los distintos plásmidos que portan los alelos mutantes de <i>CaSEC14</i>	95
Figura 27. Distintas cepas obtenidas durante la construcción de un mutante de <i>C. albicans</i> termosensible.....	96
Figura 28. Estrategia para la construcción de un mutante de <i>C. albicans</i> termosensible en <i>CaSEC14</i> y análisis de las cepas obtenidas mediante Southern blot.....	96
Tabla IX. Morfología presentada por diferentes clones termosensibles de <i>C. albicans</i> tras 24 h de incubación en YED a 30 °C y en suero a 37 °C.....	99
Figura 29. Detección mediante PCR de los alelos mutantes <i>Cassec14-1</i> y <i>Cassec14-7</i> en el genoma de <i>C. albicans</i>	101
Figura 30. Morfología colonial y celular de <i>C. albicans</i> "2.179".....	104
Figura 31. Análisis por Western blot de <i>CaSec14p</i> en extractos celulares de <i>C. albicans</i> y <i>S. cerevisiae</i>	106
Figura 32. Construcción de los plásmidos con las PITPs humanas, bajo el control del promotor GAL1: <i>pYPIα</i> y <i>pYPIβ</i>	108
Figura 33. Estudio de la complementación del fenotipo termosensible de CTY1-1A por las PITPs humanas.....	109
Tabla X. Frecuencia de interrupción de los alelos de algunos genes de <i>C. albicans</i> con la construcción <i>hisG-CaURA3-hisG</i>	114
Figura 34. Posibilidades de eliminación de los alelos <i>Cassec14-1</i> o <i>Cassec14-7</i> del genoma de <i>C. albicans</i>	117
Figura 35. Utilización de la cepa CNC43 de <i>C. albicans</i> para comprobar si un determinado gen de esta especie es esencial para el crecimiento celular.....	119
Tabla XI. Porcentajes de homología compartido entre proteínas de <i>C. albicans</i> y las correspondientes de <i>S. cerevisiae</i>	121
Figura 36. Ejemplos de sistemas <i>in vivo</i> de búsqueda de fármacos antifúngicos con la selectividad adecuada.....	127

ABREVIATURAS

Δ	delección
A	absorbancia o adenina
aa	aminoácido
ARS	secuencia de replicación autónoma
ARF	factor de ribosilación de ADP
ATCC	American Type Culture Collection (colección americana de cultivos tipo)
ATP	adenosíntrifosfato
BCIF	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
C	citosa
CECT	colección española de cultivos tipo
DNA	ácido desoxirribonucleico
DAG	diacilglicerol
D.O.	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilén diamino tetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
g	gramos
G	guanina
GDP	guanosindifosfato
GTP	guanosintrifosfato
5-FOA	ácido 5-fluoroorótico
h	horas
HRBP	proteína humana de unión a retinaldehído
IP3	inositol 1,4,5 trifosfato
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
l	litros
M	molar
MAP	proteína activada por mitógenos
mM	milimolar
mg	miligramos
ml	mililitros
ms	milisegundo
MUG	4-metil umbeliferil β -D-glucopiranosido
μ g	microgramos
μ l	microlitros
μ m	micrómetros
nm	nanómetros
Ω	ohmios
ORF	marco abierto de lectura
PA	ácido fosfatídico
pb	pares de bases
PC	fosfatidilcolina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PE	fosfatidiletanolamina
PI	fosfatidilinositol
pl	punto isoeléctrico
PI4K	fosfatidilinositol-4-quinasa
PIP ₂	fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP5K	fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa
PITP	proteína de transferencia de fosfatidilinositol
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C

PLD	fosfolipasa D
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RE	retículo endoplásmico
S	sorbitol
SM	esfingomielina
SNAREs	proteínas que marcan las vesículas de secreción y las membranas de los distintos compartimentos de la ruta de secreción de proteínas
SRP	partícula de reconocimiento de la secuencia señal de entrada en la ruta de secreción
T	timina
TGN	<i>trans</i> -Golgi network (red del <i>trans</i> -Golgi)
ts	termosensible
V	voltios
v	volúmen
°C	grados centígrados

INTRODUCCIÓN

1. *Candida albicans*.

El estudio de *Candida albicans* ha experimentado un considerable auge en los últimos años debido al importante aumento del número de pacientes que sufren infecciones producidas por este microorganismo. La causa de dicho aumento hay que buscarla, sobre todo, en la aparición del SIDA, en la extensión del cáncer y en el aumento del número de transplantes; todo lo cual ha generado un gran incremento de personas inmunosuprimidas susceptibles de contraer infecciones por *C. albicans*. La necesidad imperiosa de nuevos agentes antifúngicos eficaces, que no presenten problemas como la toxicidad y la aparición de cepas resistentes, es uno de los motivos que impulsan a la investigación en *C. albicans*. Otro motivo importante surge de las características biológicas especiales que presenta esta levadura, ya que la capacidad de realizar un proceso de transición entre dos formas de crecimiento distintas hace fascinante su estudio a nivel básico para tratar de entender el mecanismo por el que se lleva a cabo dicho proceso.

1.1. Características biológicas.

1.1.1. Características generales.

C. albicans es una levadura con un tamaño medio de 4 a 6 μm de diámetro (Saltarelli, 1989). Suele vivir en la superficie de la piel y las mucosas humanas sin ocasionar ningún tipo de problema, pero en situaciones de inmunodepresión puede causar infecciones superficiales o sistémicas.

C. albicans se clasifica como un hongo imperfecto por no tener un ciclo sexual conocido, lo que ha hecho que se introduzca dentro de la familia *Cryptococcaceae*. Pertenece al género *Candida*, que está formado por 30 especies y se puede identificar basándose en los azúcares que es capaz de fermentar y asimilar (Saltarelli, 1989). Otra característica clave a la hora de identificar esta especie es su capacidad de realizar la transición dimórfica.

El color blanco de las colonias de *C. albicans* también es característico, así como la capacidad presentada, sobre todo por determinadas estirpes, de cambiar de morfología colonial. Este último fenómeno, denominado "switching", se produce con elevada frecuencia en esta especie y, en ocasiones, se ha relacionado con la evasión de las defensas del huésped en pacientes con candidiasis (Nombela *et al.*, 1989). También se ha apuntado la posible relevancia del "switching" en el proceso de adaptación a los distintos ambientes de crecimiento del hongo (Soll, 1992). Debido a la falta de ciclo sexual, *C. albicans* no genera variabilidad mediante la meiosis, por lo tanto este "switching" puede ser uno de los mecanismos que ha desarrollado esta especie para generar esa variabilidad fundamental para su adaptación a los distintos entornos (Soll, 1992). Uno de los cambios más comunes es el de colonias lisas a colonias rugosas. Éste,

en concreto, está asociado con el proceso de transición dimórfica, ya que en las colonias lisas la morfología celular es de levadura y, sin embargo, las rugosas están constituidas por micelio (Pomés *et al.*, 1985; Slutsky *et al.*, 1985). Otro de los cambios morfológicos, y uno de los más estudiados, es la transición que presentan algunas cepas de este microorganismo de colonias blancas y cremosas a colonias grises y opacas (transición “white-opaque”, en *C. albicans* WO-1) (Soll, 1993; Soll, 1992). Algunos genes específicos de cada una de estas fases han sido clonados (*PEP1* o *Op1a* (Morrow *et al.*, 1992) y *Op4* (Morrow *et al.*, 1993) de fase opaca y *Wh11* (Srikantha y Soll, 1993) de fase blanca). Con elevada frecuencia en esta especie, pueden aparecer colonias con dos morfologías diferentes en distintos sectores de la misma. Esto, unido a la gran cantidad de aspectos diferentes que pueden presentar las colonias de ciertas cepas (que están relacionados con la proporción de levaduras, hifas y pseudohifas en diferentes sectores de la colonia) (Slutsky *et al.*, 1985) da una idea de la elevada variabilidad fenotípica presentada por *C. albicans* (Odds, 1988; Saltarelli, 1989; Soll, 1992).

1.1.2. Transición dimórfica.

Mediante el proceso denominado transición dimórfica o filamentación, levaduras *C. albicans* al ser incubadas en condiciones de inducción de este proceso, comienzan a crecer en forma de hifas. Desde el momento de la inducción, se empieza a producir a partir de la **levadura** (o **blastospora**) el denominado **tubo germinativo** (prolongación en forma de cilindro anterior a la primera septación) y, a partir de éste, se produce una división mitótica con la formación de un septo con un orificio por el que se comunican los citoplasmas de las células. La nueva célula formada presenta forma cilíndrica y no de levadura. Las posteriores divisiones se producen en el centro de la célula cilíndrica apical cuando ésta llega al tamaño adecuado, formándose de esta manera las **hifas**. También se pueden formar ramificaciones laterales y blastosporas secundarias a partir de estas hifas. A todo este conjunto se le denomina **micelio** (Odds, 1988).

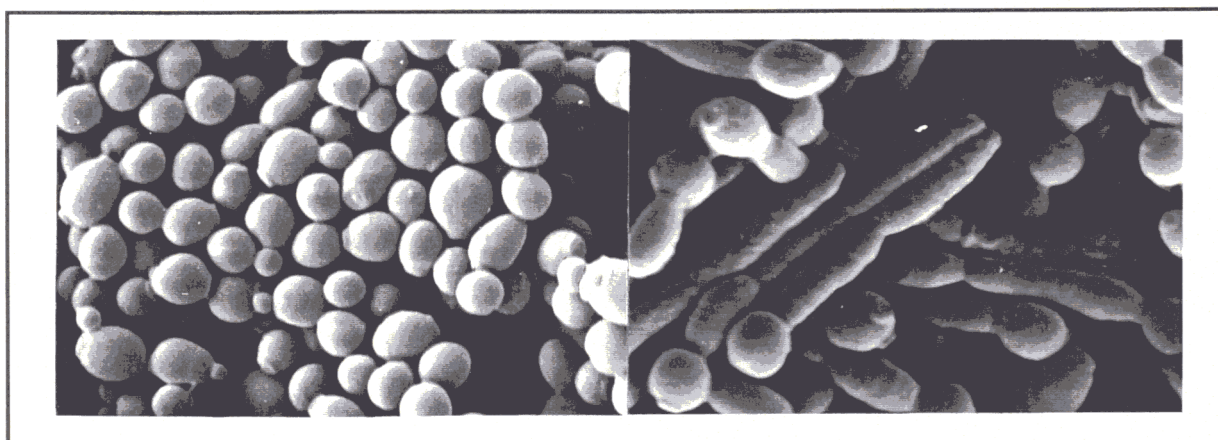


Figura 1. Células de *C. albicans* con distintas morfologías. Levaduras o blastosporas (a la izquierda) e hifas (a la derecha).

C. albicans crece, normalmente, en forma de levaduras que se multiplican por gemación pero, en ocasiones, crece como **pseudohifas**. Éstas son, en realidad, levaduras más alargadas que no se han separado totalmente y que, por tratarse de células totalmente formadas, pueden ser separadas mecánicamente (Gow y Gooday,

1987; Odds, 1988). También, en determinadas condiciones de cultivo *in vitro*, algunas células de las hifas de *C. albicans* pueden engrosar su pared y producir formas de resistencia o clamidosporas.

El estudio de la transición dimórfica se ha abordado básicamente con dos estrategias diferentes. La primera es la obtención y estudio de mutantes alterados en este proceso de forma que, bien sólo crezcan en una de las morfologías o bien sean capaces de realizar la transición dimórfica en ausencia de inductores del proceso (Gil *et al.*, 1990; Gil *et al.*, 1988; Nombela *et al.*, 1989). La segunda estrategia consiste en el estudio comparativo de las células de una determinada cepa creciendo en condiciones de inducción de la filamentación con las mismas células en condiciones de crecimiento levaduriforme (estudios de diferente expresión de genes, etc.).

La filamentación se produce como respuesta a un estímulo existente en el ambiente de crecimiento de la levadura. Éste puede ser de muy variada naturaleza: aumento de la temperatura, incremento del pH, entrada de las células en fase de carencia de nutrientes o adición al medio de incubación de una serie de sustancias como suero sanguíneo, N-acetilglucosamina, estradiol (Madani *et al.*, 1994) o ciertos aminoácidos (prolina, medio de Lee (Lee *et al.*, 1975)) (Culter, 1991; Odds, 1988; Soll, 1986).

La manera en que el estímulo del medio externo es detectado por las levaduras, se transmite al interior y desencadena los cambios necesarios para que se produzca la transición dimórfica es muy poco conocida. Se ha propuesto que el estímulo inductor produciría un mensaje intracelular que, directamente o a través de cambios en componentes citoplasmáticos, modificaría el citoesqueleto de la levadura y el patrón de la biosíntesis de la pared celular. Estas alteraciones llevarían a cambios en la composición y grosor de la pared, así como en el sitio de gemación, lo que desembocaría finalmente en el inicio de la formación de una hifa (Cannon *et al.*, 1994).

Con respecto a la forma en que se transmite la señal de inducción de la filamentación en el interior celular, algunos genes de *C. albicans* (homólogos a genes de la vía de transducción de señales de apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae*) han sido implicados en una ruta de transducción de señales de *C. albicans* que interviene en el desarrollo de las hifas. Estos genes son: *CST20* (codifica la proteína homóloga a la proteína quinasa Ste20p (Köhler y Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996)), *HST7* (codifica un homólogo de la MAP quinasa quinasa Ste7p (Clark *et al.*, 1995)) y *CPH1* (codifica el homólogo del activador transcripcional Ste12p (Liu *et al.*, 1994; Malathi *et al.*, 1994)). La interrupción de estos genes en *C. albicans* suprime la formación de hifas en ciertas condiciones (Köhler y Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1994). De todas formas, mutantes en la mencionada vía todavía pueden formar hifas en respuesta a suero, lo que sugiere la existencia de otras rutas de señalización implicadas también en este proceso.

El mecanismo molecular que regula el proceso de la transición dimórfica debe de ser bastante complejo. Hasta la fecha, muchos de los esfuerzos realizados para su comprensión han llevado, en muchas ocasiones, a la descripción de genes con expresión diferencial en fases de levadura y de micelio o de proteínas con distinto grado de actividad en las dos morfologías, pero no al hallazgo de los genes implicados en la propia regulación de dicho proceso de transición dimórfica.

Así, se han identificado genes cuya expresión se encuentra inducida como respuesta al desarrollo de las hifas, como son *ECE1* (asociado con el crecimiento del micelio) (Birse *et al.*, 1993), *HYR1* (Bailey *et al.*, 1996) y *HWP1* (Staab *et al.*, 1996). Estos dos últimos posiblemente codifican proteínas de pared. El hecho de que genes

relacionados con la pared celular se regulen en la transición dimórfica es de esperar, ya que esta estructura presenta diferente composición en levaduras y micelios (Cannon *et al.*, 1994). También los genes *CHS2* (Gow *et al.*, 1994) y *CHS3* (Sudoh *et al.*, 1993), que codifican las enzimas de síntesis de pared celular quitinsintetasa 2 y 3 respectivamente, aumentan su expresión durante la transición levadura-micelio. Otros genes cuya expresión se correlaciona con la producción de hifas a pH neutro son *SAP4*, *SAP5* y *SAP6*, que codifican proteinasas aspárticas de secreción (Hube *et al.*, 1994).

También se conocen genes cuya expresión es mayor en levaduras que en hifas. Entre éstos se encuentra *SAP2* (Hube *et al.*, 1994), que codifica la proteinasa aspártica de secreción más estudiada de *C. albicans* y *Wh11* que sólo se expresa en la levadura en fase blanca de la transición "white-opaque" (Srikantha y Soll, 1993). La expresión del gen *CPY1*, que codifica la enzima vacuolar carboxipeptidasa Y, se encuentra regulada negativamente durante los primeros estadios de la transición levadura-micelio (Mukhtar *et al.*, 1992). También, la expresión del factor de transcripción Efg1p está regulada a nivel transcripcional, de manera que disminuye hasta niveles muy bajos en condiciones de inducción de la formación de hifas (Stoldt *et al.*, 1997). Se ha propuesto que este gen, *EFG1*, puede actuar como activador y como represor transcripcional y que se encuentra implicado en la regulación de la morfogénesis de las levaduras, hifas y pseudohifas de *C. albicans*.

Se han descrito, asimismo, proteínas cuyas actividades se encuentran reguladas por el proceso de transición dimórfica, pero no varían los niveles de mRNA del gen correspondiente. Así, la H⁺-ATPasa codificada por *PMA1* muestra su cinética alterada en los tubos germinativos (Monk *et al.*, 1993) y la actividad de la ornitina descarboxilasa (codificada por el gen *ODC*) se eleva mucho en el momento inicial de la inducción del dimorfismo (Domínguez, 1996).

En la búsqueda de genes con expresión diferencial en ambas morfologías, se han encontrado algunos que están regulados, en realidad, por el factor utilizado para inducir la transición dimórfica más que por el proceso en sí. Precisamente, una de estas estrategias condujo a la clonación de *PHR1*. *PHR1* y *PHR2* son dos genes homólogos cuya expresión se regula por las variaciones de pH del medio externo. El primero se expresa a pH superior a 5,5, mientras que *PHR2* tiene su mayor expresión a pH 4 ó 5. La delección de cualquiera de ambos genes produce defectos morfogénéticos en células creciendo al pH en que se expresan (Fonzi, 1996; Saporito-Irwin *et al.*, 1995). También el gen *HEX1*, que codifica la β -N-acetilglucosaminidasa y se clonó a partir de la purificación de esta enzima del medio de cultivo, tiene su transcripción inducida en presencia de N-acetilglucosamina (inductor de la filamentación) (Cannon *et al.*, 1994a).

Todo lo expuesto anteriormente parece indicar que, aunque la expresión de muchos genes se encuentra regulada en el proceso de transición dimórfica, los factores que la regulan se podrían expresar por igual en ambas morfologías (Brown, 1996). Muy recientemente, se ha descrito que la disrupción del gen *RBF1* de *C. albicans* produce alteraciones de la morfología de los filamentos en todos los medios probados (Ishii *et al.*, 1997). Este gen tiene un dominio de unión a DNA y, además, la proteína que codifica se localiza en el núcleo, por lo que se sugiere que podría tratarse de un factor de transcripción que podría estar implicado en la regulación de transición levadura-micelio.

La relación del dimorfismo con la virulencia es muy controvertida (Odds, 1988; Ryley y Ryley, 1990). A pesar de que se ha sugerido la mejor adaptación de las hifas a penetrar en la piel dañada (Sherwood *et al.*, 1992) y parece que éstas juegan un papel importante en el proceso inicial de invasión, ambas morfologías tienen capacidad de

iniciar respuestas patológicas en mamíferos y, normalmente, de tejidos infectados se aísla una mezcla de levaduras, hifas y pseudohifas. No se puede relacionar solamente a una de las morfologías de *C. albicans* con la infección y es posible que sea la facilidad para cambiar de una forma de crecimiento a otra la que contribuya a su capacidad patógena (Odds, 1988).

1.1.3. Genética de *C. albicans* y herramientas para su manipulación.

La determinación del contenido en DNA de *C. albicans* y de la cinética de reasociación de este DNA desnaturalizado (Olaiya y Sogin, 1979; Riggsby *et al.*, 1982) llevó a la conclusión de que se trata de un microorganismo diploide. Dicha conclusión se confirmó con la determinación de su ploidía basada en estudios genéticos (Kurtz *et al.*, 1988; Whelan y Magee, 1981; Whelan *et al.*, 1980). Esta diploidía de *C. albicans* y la carencia de ciclo sexual conocido implican dificultades en la manipulación genética de este microorganismo que han supuesto trabas importantes para el desarrollo de su estudio a nivel genético.

El elevado grado de recombinación mitótica observado en *C. albicans* (Whelan y Soll, 1982), así como el gran número de reorganizaciones cromosómicas detectado son dos mecanismos que podría utilizar dicha especie para generar variabilidad genética en ausencia de ciclo meiótico. El genoma de *C. albicans* está organizado en ocho pares de cromosomas homólogos pero se observan importantes diferencias cariotípicas entre las distintas cepas y aislados clínicos (Asakura *et al.*, 1991; Chu *et al.*, 1993; Mahrous *et al.*, 1990; Navarro-García *et al.*, 1995a). El conocimiento de la organización de este genoma, así como la localización de genes en los distintos cromosomas (Iwaguchi *et al.*, 1990; Wickes *et al.*, 1991), están sufriendo un considerable avance gracias al proyecto de creación de un mapa completo de los cromosomas de *C. albicans* (Chu *et al.*, 1993; Magee *et al.*, 1996). También se avanza continuamente en la visión global del conjunto de los genes de esta levadura debido al proyecto de secuenciación de su genoma completo en el que se encuentran implicados varios laboratorios (Magee *et al.*, 1996).

Respecto a las posibilidades de manipular genéticamente a *C. albicans*, hasta hace relativamente poco tiempo sólo era posible obtener mutantes con distintos agentes mutágenos y forzar sus cruces; sin embargo se carecía de las herramientas necesarias para el posterior estudio de los defectos genéticos de estos mutantes o para cualquier otro tipo de manipulación genética. Muchos son los avances recientes en este campo, como la puesta a punto de sistemas de transformación tanto integrativa (por recombinación homóloga) (Kurtz *et al.*, 1986) como no integrativa. Esta última ha sido posible gracias al aislamiento de secuencias de replicación autónoma de esta especie (ARS) y al desarrollo de vectores autoreplicativos basados en ellas (Cannon *et al.*, 1992; Cannon *et al.*, 1990; Goshorn *et al.*, 1992; Herreros *et al.*, 1992; Kurtz *et al.*, 1987; Pla *et al.*, 1995).

Otra de las herramientas importantes, surgida recientemente, ha sido la adaptación por Fonzi e Irwin (Fonzi y Irwin, 1993) del sistema de interrupción génica utilizado en *S. cerevisiae* (Alani *et al.*, 1987). Estos autores también construyeron la cepa de *C. albicans* CA14 (con el gen *URA3* delecionado), adecuada para la utilización de este sistema. En este método de interrupción génica se utiliza el marcador *URA3* de *C. albicans* (CaURA3) flanqueado por dos copias del gen *hisG* de *Salmonella typhimurium*. Esta construcción se introduce en el gen a interrumpir, dejando a ambos lados de *hisG*-CaURA3-*hisG* suficiente zona del gen de interés como para que se

produzca recombinación homóloga. Todo ello será utilizado para integrarlo en el genoma de la levadura e interrumpir ambos alelos secuencialmente. Entre los dos pasos de interrupción se fuerza la recombinación entre las dos copias de *hisG* a ambos lados del gen marcador y se seleccionan, mediante crecimiento en placas con ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), aquellos clones que hayan expulsado el mencionado gen *URA3*. Este método de interrupción génica presenta varias ventajas frente a otros sistemas utilizados anteriormente (Gorman *et al.*, 1991; Kelly *et al.*, 1988; Kelly *et al.*, 1987; Kurtz y Marrinan, 1989). Una ventaja es la posibilidad de recuperar la auxotrofía frente a uracilo. Esto permite poder volver a usar el gen *URA3* como marcador de transformación en posteriores interrupciones de otros genes en la estirpe obtenida con un gen interrumpido. Otra ventaja es que la cepa CA14 no ha sido sometida a ningún proceso de mutagénesis al azar, el cual podría provocar mutaciones silenciosas en dicha cepa, pero que podrían modificar las características fenotípicas de estirpes obtenidas en interrupciones posteriores de otros genes.

Recientemente, se ha descrito una variación de este sistema, que presenta la ventaja de permitir la interrupción de las dos copias de un gen en un solo paso de transformación con dos marcadores de selección diferentes, gracias a la construcción de una cepa con dos genes de auxotrofía interrumpidos (Negredo *et al.*, 1997).

Con el desarrollo de todos estos sistemas, el estudio de la biología molecular de *C. albicans* ha experimentado un gran auge. Se ha clonado un número importante de genes utilizando tanto métodos de hibridación como por complementación funcional del fenotipo de mutantes de *Escherichia coli*, *S. cerevisiae* e incluso de la propia *C. albicans* (Pla *et al.*, 1996). Muchos de estos genes han sido interrumpidos en sus dos copias (Bailey *et al.*, 1996; Köhler y Fink, 1996; Liu *et al.*, 1994; Navarro-García *et al.*, 1995; San José *et al.*, 1996; Sanglard *et al.*, 1997) y se han estudiado las características fenotípicas de los mutantes obtenidos, pudiendo de esta forma conocer sus posibles implicaciones en procesos tan importantes como el dimorfismo o la virulencia (Becker *et al.*, 1995; Díez-Orejas *et al.*, 1997; Gow *et al.*, 1994; Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Sarthy *et al.*, 1997).

En el momento actual, los dos tipos de herramientas en desarrollo más necesarias para la manipulación genética de este microorganismo son los genes indicadores y los promotores regulables. Los genes indicadores del nivel de expresión de otros genes pueden provenir de otros microorganismos o de la misma *C. albicans*. La expresión de genes heterólogos en *C. albicans* tiene la dificultad añadida de que el código genético de esta levadura presenta variaciones con respecto al código universal, ya que el codón CTG que normalmente se traduce por leucina, codifica serina en esta especie (Santos *et al.*, 1993; Santos y Tuite, 1995; White *et al.*, 1995). Como genes indicadores heterólogos, en *C. albicans* se han utilizado: el gen *LAC4* de *Kluyveromyces lactis* (Leuker *et al.*, 1992), el gen que codifica la luciferasa de *Renilla reniformis* (Srikantha *et al.*, 1996) y el gen cuyo producto es la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*. *LAC4* presenta un codón CTG pero la enzima codificada en *C. albicans* sigue teniendo su actividad β -galactosidasa, la luciferasa no presenta ninguno de estos codones y, en el caso de GFP, el codón CTG del gen original se ha cambiado por TTC (leucina) y el uso de codones se ha optimizado genéticamente para obtener una proteína que se expresa de forma eficiente en *C. albicans* (Cormack *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha puesto a punto la utilización como indicador del gen *XOG1* de *C. albicans*, que codifica la actividad exoglucanasa mayoritaria de esta levadura y, por lo tanto, no presenta los problemas derivados de la expresión heteróloga (González *et al.*, 1997; Sánchez, 1996).

También se están estudiando los distintos tipos de promotores (fuertes, regulables, etc) para poder utilizarlos en la manipulación genética. Hasta la fecha ya se

han estudiado y utilizado algunos (como los de genes *GAL1*, *WH11*, *OP4*, *EF1- α 2* (Srikantha *et al.*, 1996), *MAL2* (Brown, 1996; Cormack *et al.*, 1997), *HEX1* (Mio *et al.*, 1997) y *PCK1* (Stoldt *et al.*, 1997)) pero el reto más importante de los últimos años ha sido la descripción de algún promotor regulable que pueda someter al gen en estudio a un nivel de expresión totalmente nulo en determinadas condiciones de crecimiento. De esta forma, se podría estudiar la esencialidad de genes clonados, lo que supone un dato fundamental para su posible utilización como diana en el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos. Muy recientemente, se ha descrito la utilización del promotor del gen *MRP1*, inducible por maltosa, en la construcción de una cepa en la que uno de los alelos del gen *TOP1* de *C. albicans* estaba delecionado y el otro bajo el control de dicho promotor (Jiang *et al.*, 1997). En la cepa mutante obtenida, en condiciones de represión, no se detectó la actividad DNA topoisomerasa I que presenta la proteína codificada por *TOP1*, lo que sugiere que este promotor podría ser utilizado en el estudio de la esencialidad de los genes de *C. albicans*.

1.2. Importancia clínica: candidiasis.

Las infecciones fúngicas no son enfermedades de declaración obligatoria en España. Por este motivo no se conoce la incidencia real de este tipo de enfermedades en nuestro país. A pesar de esto, es aceptado a nivel mundial que se está produciendo un gran aumento de las infecciones producidas por hongos en las últimas décadas. En los años 1993 y 1994, algo más del 7 % (7,6 % y 7,8 %, respectivamente) de las infecciones comunitarias en nuestro país eran de origen fúngico, así como alrededor del 6 % (6,2 % y 5,2 %) de las infecciones nosocomiales. Las especies del género *Candida* producen el número más elevado de estas infecciones por hongos y, entre ellas, destaca *C. albicans* que es la que se aísla con mayor frecuencia, ocupando del cuarto al séptimo lugar de todos los diagnósticos etiológicos de infecciones tanto comunitarias como nosocomiales (exceptuando las bacteriemias) desde el año 1990 hasta 1994 (Grupo de trabajo EPINE, 1995). Datos recogidos en los Estados Unidos entre los años 1980 y 1990 señalan una duplicación de la incidencia de las infecciones fúngicas en esta etapa, así como la elevada proporción de aislados de *Candida* en las infecciones nosocomiales y, en concreto, de *C. albicans* (Beck-Sagué *et al.*, 1993; Fridkin y Jarvis, 1996). Otros datos de este mismo país, del período transcurrido entre 1986 y 1990, exponen que las especies del género *Candida* ocupaban el quinto lugar en la lista de las especies más comúnmente aisladas en hemocultivos de pacientes hospitalizados, así como el cuarto lugar entre las especies patógenas recogidas en Unidades de Cuidados Intensivos (Edwards, 1991).

1.2.1. Infecciones producidas por *C. albicans*.

C. albicans puede encontrarse de forma habitual en la flora normal del tracto gastrointestinal, en la vagina o en la cavidad oral de individuos sanos. Cuando la relación entre el huésped y *C. albicans* se ve alterada por cualquiera de una serie de factores, se puede propiciar la producción de infecciones por parte del hongo. Una relación de estos factores que predisponen al huésped a la infección por *C. albicans* se expone en la tabla I. De ésta, se puede destacar que la mayoría de dichos factores están relacionados con disfunciones en el sistema inmunitario del huésped. Muchos de estos factores son bastante frecuentes en la actualidad y no eran comunes hace algunas décadas, lo que

podría explicar el aumento tremendo de este tipo de infecciones que ha tenido lugar en los últimos años. Son característicos de nuestra época: el uso indiscriminado de antibióticos, la infección por VIH, los tratamientos de inmunosupresión en pacientes con órganos transplantados, el uso de quimioterapia, la adicción a drogas por vía parenteral y el uso de catéteres y sondas intravenosas que facilitan al microorganismo una vía de entrada en la sangre (Fridkin y Jarvis, 1996).

Tabla I. Factores que predisponen a la aparición de los distintos tipos de infecciones producidas por *C. albicans*. Adaptada de Matthews (Matthews, 1994).

Tipo de infección	Presentaciones más comunes	Factores típicos de predisposición
Superficial	Oral Vaginal Cutánea	Antibióticos Embarazo Diabetes Infección por VIH Función alterada de granulocitos Drogas inmunosupresoras Infancia Vejez Trauma (prótesis dentales)
CMC (candidiasis mucocutánea crónica)	Múltiples afectaciones superficiales	A menudo familiares Deterioro de la inmunidad que protege piel y mucosas
Sistémica	Diseminada Afectación de ciertos órganos	Leucemia aguda Linfoma agudo Quimioterapia citotóxica Corticosteroides Antibióticos de amplio espectro Transplantes de órganos Catéteres intravasculares Quemados severos Cirugía gastrointestinal Adictos a drogas por vía parenteral

Las infecciones producidas por *C. albicans* se clasifican en candidiasis superficiales y candidiasis sistémicas.

1.2.1.1. Candidiasis superficiales.

Las candidiasis superficiales pueden ser agudas o crónicas y, según su localización, se clasifican en candidiasis orofaríngea, vulvovaginitis candidiásica, candidiasis cutánea (intertrigo, onicomycosis, etc) y candidiasis mucocutánea crónica (CMC) (Kirsch *et al.*, 1990; Matthews, 1994). A excepción de la candidiasis mucocutánea crónica, el resto de las formas se localizan en una determinada zona de la piel o mucosas.

La candidiasis orofaríngea en los pacientes infectados por VIH y la vulvovaginitis recurrente representan problemas clínicos importantes:

-La candidiasis orofaríngea es una de las micosis humanas más frecuentes. Puede aparecer en personas de cualquier edad, pero es más frecuente en lactantes, ancianos y portadores de prótesis dentales. En personas VIH-seropositivas, la aparición de un episodio de este tipo de candidiasis se considera como pronóstico de la infección clínica del virus. En este tipo de pacientes, la enfermedad se presenta de forma más severa y con tendencia a la cronicidad o recaída; la existencia frecuente de nuevos episodios trae consigo el que la aparición de resistencias a los agentes antifúngicos que se estaban usando pueda presentar un problema clínico grave (Quindós, 1996).

-La candidiasis vulvovaginal es muy frecuente entre las mujeres en edad fértil, pero con un tratamiento antifúngico con azoles desaparecen en la mayoría de los casos. Existe un pequeño porcentaje de mujeres en las que estos episodios se repiten, presentando una vulvovaginitis candidiásica recurrente. Se han apuntado algunos mecanismos como productores de esta enfermedad, pero en muchos casos se desconocen (Quindós, 1996). La terapia antifúngica es útil en la fase aguda de la enfermedad, pero no es eficaz para la erradicación de la misma.

En la candidiasis mucocutánea crónica se encuentran afectadas diferentes zonas superficiales, pero no suele producirse infección sistémica o profunda. Esta manifestación de la infección por *C. albicans* está asociada con desórdenes inmunológicos aparentemente limitados a la inmunidad que protege la superficie de la piel y las mucosas (Cleary, 1985; Odds, 1988).

1.2.1.2. Candidiasis sistémicas.

El término candidiasis sistémica se utiliza en los casos en los que *Candida* se encuentra en la sangre del paciente; puede ocurrir con invasión de tejidos o sin ella y con uno o muchos órganos como origen de la infección (Bodey y Fainstein, 1985). Para que se produzca este tipo de infección, primero tiene que permitirse al hongo penetrar en el torrente sanguíneo, para que luego desarrolle la infección si el sistema inmunitario del huésped se encuentra alterado.

En la mayoría de los casos (sobre un 50 %) las candidiasis sistémicas están causadas por *C. albicans*, aunque las infecciones por *C. tropicalis* están aumentando. Menor es la incidencia de otras especies, como *C. parapsilopsis*, *C. krusei* y *C. pseudotropicalis*. Los órganos que pueden ser objeto de infección por *Candida* son los siguientes: riñones, hígado, pulmones, bazo, corazón y tracto gastrointestinal (Odds, 1988).

Los dos grandes problemas de las candidiasis sistémicas son el diagnóstico y el tratamiento. El diagnóstico de esta enfermedad se realiza en muchas ocasiones después de la muerte del paciente (Fridkin y Jarvis, 1996), lo que ha producido que exista un gran empeño en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico que permitan una identificación más rápida y fiable del agente etiológico de que se trata. El hemocultivo es el método clásico para el diagnóstico de este tipo de infección, pero puede presentar problemas como que el microorganismo no sea detectado, ya que la presencia de éste en sangre es transitoria y, además, las células fúngicas pueden estar dentro de fagocitos o

atrapadas en los capilares sanguíneos. La aplicación de la biología molecular a la identificación de esta especie, el desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos específicos de este género, así como el desarrollo de otras técnicas que detectan componentes fúngicos o de la respuesta del paciente al hongo, están permitiendo la aparición en el mercado de métodos nuevos y rápidos de identificación de este agente patógeno (Pontón, 1996; Quindós *et al.*, 1997).

1.2.2. Factores de virulencia.

Las características de *C. albicans* que le capacitan para realizar el cambio entre la forma saprófita y la forma patógena de crecimiento parecen ser bastante complejas. Dentro de estos factores de virulencia se encuentran: su capacidad de adhesión a superficies, la capacidad de producción de enzimas líticas y las variaciones tanto morfológicas como de la composición de su pared externa.

La capacidad de adhesión de las células de *Candida* a superficies contribuirá a su fijación a células epiteliales, plaquetas, etc. Las interacciones hidrofóbicas parecen tener importancia en la adhesión de *Candida* al plástico (Matthews, 1994), así como en la adhesión a las células del huésped. Las adhesinas existentes en la superficie de las células de *C. albicans* también son muy importantes en este proceso. Éstas son receptores específicos formados por manoproteínas que se unen a diferentes moléculas del huésped. Los tipos de uniones que se producen pueden ser proteína-oligosacárido o proteína-proteína. Las adhesinas son de dos tipos, el primero de los cuales reconoce ligandos glicosídicos (residuos de fucosa o de N-acetilglucosamina) y el segundo, formado por moléculas parecidas a las integrinas humanas, reconoce la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) de proteínas del huésped (como los componentes del sistema del complemento iC3b y C3d, el fibrinógeno, etc.) (Calderone, 1993). Se han propuesto como posibles adhesinas: una glicoproteína de 60 kDa, que actuaría como receptor de C3d (Calderone *et al.*, 1988), y las proteínas codificadas por los genes α INT1 (una integrina), PRS1 y ABCCA (Calderone y Sturtevant, 1996).

La secreción de enzimas líticas por parte de *C. albicans*, entre las que se encuentran proteinasas y fosfolipasas, contribuye a la invasión tisular mediante degradación de compuestos estructurales de las células del huésped. Dentro de estas enzimas secretadas por *Candida*, las que más se han estudiado son las proteinasas aspárticas. Éstas son un clásico factor de virulencia y están codificadas por varios genes, denominados SAP (desde SAP1 hasta SAP7). Algunos de estos genes se expresan en medios ácidos y otros en distintas condiciones de crecimiento (Hube *et al.*, 1994).

La capacidad de *C. albicans* de crecer con diferentes morfologías también contribuye al desarrollo de la infección por este microorganismo. La transición dimórfica ayuda al hongo a escapar del sistema inmunitario del huésped por dificultar la fagocitosis (Culter, 1991); además, los antígenos de superficie que presenta la forma de crecimiento levaduriforme son distintos a los que se encuentran en la forma micelial (Casanova *et al.*, 1989). En la transición "white-opaque" también se han observado cambios en la expresión antigénica (Soll, 1992) que podrían estar implicados en evadir la respuesta inmunitaria. Por último, la posibilidad de *C. albicans* de modificar la expresión de diferentes residuos de manano en su superficie según las condiciones de crecimiento, también es importante, ya que este proceso ha sido implicado en la modulación de la respuesta inmunológica (Poulain, 1996).

1.3. Tratamientos actuales y desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos.

1.3.1. Características del antifúngico ideal.

En la actualidad existe un cierto número de fármacos que se utilizan tanto para el tratamiento de las infecciones producidas por el género *Candida* como para otros tipos de infecciones por hongos. Dichos fármacos presentan algunas limitaciones con respecto a su potencia, espectro de acción, seguridad o propiedades farmacocinéticas (Georgopapadakou y Walsh, 1996). Un hipotético antifúngico que cumpliera todos los requisitos expuestos a continuación sería el fármaco ideal para tratar este tipo de infecciones. Los mencionados requisitos son:

- Ser fungicida.
- Presentar un amplio espectro de acción.
- No presentar toxicidad frente a las células de mamífero y así evitar daños al paciente.
- Tener buenas características farmacocinéticas y una sencilla forma de administración.
- Poseer un mecanismo de acción que no propicie la aparición de resistencias.

La consecución de productos con estas características es uno de los motores que actualmente impulsa la investigación en *C. albicans*.

1.3.2. Antifúngicos actuales.

Los antifúngicos más comúnmente utilizados se describen brevemente a continuación.

1.3.2.1. Anfotericina B y nistatina.

Son fármacos del grupo de los antibióticos macrólidos poliénicos. Éstos son compuestos producidos por especies del género *Streptomyces*. Son fungicidas y presentan el mayor espectro de acción de todos los antifúngicos. Su mecanismo de acción se basa en su interacción con los esteroides de la membrana plasmática, formando un poro que provoca la salida de cationes intracelulares y lleva a la muerte celular. Tienen mayor afinidad por el ergosterol de la membrana celular fúngica que por el colesterol de las células de mamífero (Kerridge, 1986), pero de todas formas presentan toxicidad y efectos secundarios frecuentes, entre los que destacan daños renales, anemia y concentraciones de potasio en sangre anormalmente bajas (Saballs, 1996).

La **anfotericina B** es el antifúngico de referencia, ya que es útil para tratar cualquier forma de micosis y no suelen aparecer resistencias en clínica. En candidiasis sistémica es el fármaco de elección. Su elevada insolubilidad hace que no se pueda administrar por vía oral. Se administra por vía intravenosa en dilución con suero y con controles constantes, ya que pueden producirse problemas como tromboflebitis. Para

poder aumentar la dosis y disminuir los problemas de toxicidad se han propuesto distintas formulaciones: liposomas, complejos lipídicos y dispersiones de sulfato coloidal (Brajtborg y Bolard, 1996; Janknegt *et al.*, 1996; Schmitt, 1993). Con algunas de éstas, se ha conseguido disminuir la nefrotoxicidad, pero aunque en algunos estudios con animales muestren índices terapéuticos mayores que la anfotericina B clásica, para conseguir buenos resultados clínicos, con algunas de ellas, se necesitan dosis muy elevadas (Janknegt *et al.*, 1996). Parece que los datos obtenidos en animales sobre la eficacia de estas formulaciones dependen del modelo probado y que pueden no ser transferibles al modelo humano. La mejor manera de conocer cual es la formulación más eficaz sería hacer ensayos clínicos comparativos (Brajtborg y Bolard, 1996). Con la utilización de la anfotericina B es posible que aparezcan fenómenos de toxicidad en otro tipo de infecciones, pero dichos fenómenos son raros cuando se utiliza en infecciones producidas por *C. albicans*.

La **nistatina** es otro fármaco de este tipo que se utiliza sólo de forma tópica ya que su mala absorción no hace recomendable la administración por vía oral (Pratt, 1981). Se encuentra indicado en candidiasis bucofaríngeas y vaginales (Saballs, 1996).

1.3.2.2. 5-fluorocitosina.

Es un análogo de nucleósido. Su actividad reside en un metabolito (5-fluorouracilo) que sólo se encuentra en la célula fúngica, ya que la enzima citosina desaminasa que lleva a cabo la reacción de desaminación que lo produce no existe en las células de mamífero. De este hecho proviene su selectividad. El 5-fluorouracilo se incorpora en la síntesis de mRNA provocando problemas en la síntesis de proteínas y, además, es convertido en otro metabolito que bloquea la síntesis del DNA. Es un fármaco que se utiliza en candidiasis diseminadas en combinación con la anfotericina B, para reforzar el efecto de ambos, disminuir la toxicidad de la anfotericina B y evitar la fácil aparición de resistencias a 5-fluorocitosina (Vanden Bossche *et al.*, 1994), que pueden aparecer por mecanismos muy variados (Kirsch *et al.*, 1990).

1.3.2.3. Azoles: fármacos imidazólicos y triazólicos.

Una de las diferencias más relevantes entre las células fúngicas y las de mamífero son los esteroides de su membrana plasmática (colesterol en mamíferos y ergosterol en hongos). Aprovechando esta diferencia se han desarrollado fármacos que inhiben enzimas de la ruta de síntesis del ergosterol. Los azoles, imidazoles o triazoles según tengan dos o tres nitrógenos en el anillo azólico, inhiben la enzima 14 α -esterol demetilasa dependiente de citocromo P-450 que actúa en la síntesis del ergosterol. A pesar de la existencia de enzimas microsomales hepáticas parecidas a la enzima inhibida, existe selectividad hacia la enzima fúngica. Los azoles, en general, presentan actividad fungistática de amplio espectro, actuando sobre la mayoría de levaduras y hongos filamentosos, aunque esta actividad depende de cada compuesto en particular (Georgopapadakou y Walsh, 1996). En general, son compuestos libres de toxicidad grave, pero pueden presentar efectos secundarios relacionados con la disminución de las hormonas esteroideas, como insuficiencia adrenal o ginecomastia.

Los imidazoles de 1ª generación (**clotrimazol**, **econazol** de uso actual tópico, y **miconazol** con poco uso actual) no se pueden administrar de forma sistémica ya que se eliminan rápidamente, por lo cual para conseguir efectividad habría que aumentar la dosis y se produciría toxicidad. El **ketoconazol** es más soluble y menos susceptible a degradarse por las enzimas del hígado. También es menos tóxico y más activo que los anteriores (Fromtling, 1988). Es fungistático y se utiliza por vía oral en candidiasis generalizadas o localizadas (Saballs, 1996). Produce efectos secundarios relacionados con la alteración de la síntesis de la testosterona.

La aparición de los triazoles mejoró la farmacología, la actividad y redujo la toxicidad (por aumentar la afinidad hacia los sistemas enzimáticos dependientes del citocromo P-450 fúngicos) con respecto a los fármacos imidazólicos (Karyotakis y Anaissie, 1994). El **fluconazol** es muy útil en el tratamiento de candidiasis vaginal, oral y esofágica, por lo que se utiliza mucho en los pacientes infectados con VIH. Se puede administrar por vía oral o intravenosa y su buena farmacología ha hecho que se utilice en muchos casos como antifúngico de elección. En la actualidad, ha aparecido un gran número de cepas resistentes a los azoles, principalmente al fluconazol, asociadas con terapias continuadas en pacientes inmunocomprometidos. Esto provoca un problema clínico importante. Los mecanismos que provocan estas resistencias en *C. albicans* son muy variados: cambios o sobreproducción de la enzima diana del antifúngico, mutaciones compensatorias en otras enzimas de la ruta o cambios en la permeabilidad de la membrana de la levadura (Hitchcock, 1993). Ya se han clonado tres genes de *C. albicans* que codifican transportadores multidroga que expulsan sustancias al exterior celular y que se han implicado en este tipo de resistencias. Éstos son: *BEN* (CaMDR1) (Ben-Yaacov *et al.*, 1994; Goldway *et al.*, 1995), *CDR1* (Prasad *et al.*, 1995) y *CDR2* (Sanglard *et al.*, 1997). El **itraconazol** es otro compuesto triazólico muy lipofílico. Se administra por vía oral y puede ser útil en meningitis por criptococos o aspergilosis (aunque en ambos casos el tratamiento de elección es la anfotericina B).

1.3.2.4. Otros antifúngicos.

Además de los nombrados anteriormente, existen otros fármacos que pueden usarse tópicamente. Entre éstos están: **bifonazol**, **tioconazol**, **ciclopiroxolamina**, **tolfnaftato** (un tiocarbamato), **terbinafina** y **naftifina** (dos alilaminas) (Georgopapadakou y Walsh, 1996; Saballs, 1996). Los compuestos de tipo alilamina y tiocarbamato actúan inhibiendo la escualeno epoxidasa (otra enzima de la ruta de síntesis del ergosterol).

1.3.3. Antifúngicos en desarrollo.

Existe un número respetable de fármacos antifúngicos en el proceso de desarrollo anterior a su comercialización, algunos de los cuales se encuentran en las distintas fases de los ensayos clínicos.

Muchas de estas sustancias tienen como blanco de acción la pared celular, ya que al ser una estructura diferencial de las células fúngicas con respecto a las células de mamífero, no se presentan problemas de toxicidad. La pared celular rodea a la célula fúngica para mantener su forma y protegerla frente al medio externo. Está formada por tres tipos de polímeros, glucano, quitina y manoproteínas que, con una organización

espacial determinada, le confieren las características adecuadas. La necesidad de una pared íntegra para la supervivencia celular implica que muchas de las enzimas que intervienen en su síntesis son esenciales para el crecimiento celular y pueden ser utilizadas como dianas de productos antifúngicos:

-La síntesis de una de las fracciones del glucano, 1,3- β -glucano, es inhibida por una serie de sustancias, como los lipopéptidos o derivados **-equinocandinas, aculeacinas, cilofungina** (derivado de equinocandinas) y **pneumocandinas-** o glicolípidos **-como papulacandinas-** (Gooday, 1995). Estas sustancias son muy eficaces en laboratorio, pero suelen tener mala farmacocinética y solubilidad, lo que ha hecho que muchas no se comercialicen. Sin embargo, dos derivados semisintéticos solubles en agua y que presentan buena actividad tanto *in vitro* como *in vivo* se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos: la Equinocandina LY-303366 (fase I, Lilly), y la Pneumocandina L-743872 (fase II, Merck) (Georgopapadakou y Walsh, 1996; Gómez de las Heras, 1996).

-La síntesis de quitina es inhibida por las **polioxinas** y **nikkomicinas**. Antibióticos con estructura de péptido-nucleósido que son sintetizados por estreptomicetos. Estas sustancias inhiben potentemente dos de las enzimas implicadas en la síntesis de este polímero, pero no han sido comercializadas por presentar baja actividad frente a algunos hongos, entre los que se encuentra *C. albicans*. Esto puede deberse a su dificultad para atravesar la membrana plasmática. Este paso al interior celular se realiza mediante transportadores dipéptido-permeasa existentes en la propia membrana plasmática del hongo. Han aparecido nuevas formulaciones en las que se trata de evitar este problema de transporte y que tienen que ser evaluadas (Georgopapadakou y Tkacz, 1995).

-Las **pradimicinas** parece que forman complejos con las manoproteínas de la pared celular en presencia de Ca^{2+} (Debono y Gordee, 1994; Georgopapadakou y Tkacz, 1995). Son activas, en modelos animales, frente a candidiasis y otras infecciones fúngicas. Un derivado soluble en agua, BMS 181184 (Oki *et al.*, 1992) está siendo desarrollado (fase I, Bristol Myers Squibb). Las **benanomycininas** presentan el mismo mecanismo de acción (Oki *et al.*, 1992).

También existen algunos productos en fase de experimentación cuya diana de actuación es la enzima de síntesis de ergosterol, anteriormente mencionada, la 14 α -esterol demetilasa dependiente de citocromo P450. Entre éstos, se encuentran el **voriconazol** (fase III, Pfizer), el D-0870 (fase I, Zeneca) y SCII-56592 (fase I, Schering) (Gómez de las Heras, 1996).

1.3.4. Estrategias de búsqueda de nuevos antifúngicos.

Debido a los problemas importantes de toxicidad y aparición de resistencias de los antifúngicos utilizados en la actualidad, la necesidad de nuevos fármacos sigue siendo real.

En los procesos de búsqueda de nuevos tipos de sustancias antimicóticas se pueden utilizar dos estrategias generales que pueden ser complementarias:

- A) En una primera aproximación se buscan, por rastreo al azar, sustancias que inhiban directamente el crecimiento del microorganismo. Dichas sustancias constituirán un nuevo producto "cabeza de serie", cuyos derivados pueden ir mejorando sus características farmacológicas de toxicidad, etc. Para esto se ensayan grandes cantidades

de sustancias distintas que pueden ser de origen tanto natural (procedentes de todo tipo de nichos ecológicos) como sintetizados químicamente (Sánchez-Puelles, 1995).

- B) La otra estrategia, también muy utilizada, consiste en la búsqueda de nuevas dianas de agentes antifúngicos. Éstas son funciones de la célula fúngica que puedan ser inhibidas por nuevos fármacos. Con los correspondientes ensayos que permitan medir la actividad o inhibición de estas dianas, es posible buscar medicamentos que las inhiban y que puedan ser utilizados igualmente como "cabeza de serie" de un nuevo grupo de sustancias antifúngicas. Las características fundamentales para que un determinado gen pueda emplearse como diana son:

- que sea un gen esencial
- que esté presente en un gran número de especies patógenas, para poder obtener un producto antifúngico de amplio espectro
- que no exista un gen homólogo en mamíferos o que éste presente diferencias suficientes como para permitir desarrollar sustancias selectivas carentes de toxicidad.

Actualmente, además de la pared celular, se consideran importantes como posibles dianas de nuevos antifúngicos (Georgopapadakou y Walsh, 1996; Gómez de las Heras, 1996):

- enzimas que intervienen en la síntesis del ergosterol (distintas de la 14 α -esterol demetilasa dependiente de citocromo P-450) como la oxidoescualeno ciclasa y Δ^{24} metiltransferasa;
- la ATPasa de membrana plasmática;
- enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfatidilserina;
- enzimas que intervienen en la biosíntesis de aminoácidos: la homoserina deshidrogenasa (Yamaki *et al.*, 1990);
- enzimas de los procesos de síntesis y procesamiento de proteínas: el factor de elongación-3 (Colthurst *et al.*, 1991), la *N* miristoliltransferasa (*NMT1*) (Lodge *et al.*, 1997; Weinberg *et al.*, 1995);
- el metabolismo de ácidos nucleicos: la timidilato sintasa y la topoisomerasa II (Shen *et al.*, 1992) ;
- el metabolismo de poliaminas: la ornitina descarboxilasa (Domínguez, 1996) y la arginina descarboxilasa;
- los factores de virulencia, como el proceso de adhesión (se bloquea con péptidos que contienen Arg-Gly-Asp) (Klotz *et al.*, 1992), la proteinasa aspártica de secreción (Goldman *et al.*, 1995) o el proceso de transición dimórfica.

Cualquier otro proceso celular en el que intervengan genes que cumplan las características anteriormente mencionadas también podría ser utilizado como diana en la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos.

Una vez elegida una buena diana para encontrar las sustancias que inhiban su actividad existen varias posibilidades de actuación que se enumeran a continuación:

① Hacer rastreos con un gran número de sustancias químicas naturales o de síntesis. Estas últimas pueden producirse por síntesis química convencional o por los nuevos procesos de química combinatorial (moderno sistema que incluye un conjunto de estrategias y tecnologías capaces de producir cientos de miles de compuestos siguiendo las pautas de combinación de reacciones químicas que se les ha marcado).

② Utilizar una estrategia racional. Ésta consiste en la modelización de la estructura de rayos X de la diana en estudio, así como de sus posibles ligandos e inhibidores. Después del diseño de un posible inhibidor, éste tiene que ser posteriormente sintetizado para poder comprobar su actividad real (Gómez de las Heras, 1996; Lavandera, 1995).

El paso posterior a la obtención de un compuesto “cabeza de serie”, por cualquiera de las dos aproximaciones generales mencionadas, sería el proceso de optimización y de desarrollo del inhibidor hasta conseguir un fármaco apto para su uso clínico.

2. RUTA DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS.

En todas las células eucariotas, muchas de las proteínas sintetizadas (excepto aquellas cuya localización celular es el núcleo, el citosol, la mitocondria o el peroxisoma) son translocadas al lumen del retículo endoplásmico (RE), entrando así en la ruta de secreción de proteínas. En levaduras, desde el interior del RE, las proteínas se dirigen al aparato de Golgi donde son transportadas a través de distintas cisternas y cuando alcanzan el Golgi tardío son clasificadas, según se dirijan o a la vacuola, o a la membrana plasmática, a la pared celular, al espacio periplásmico y al exterior de la célula (figura 2). En las células de mamíferos, el proceso de secreción es similar. En este tipo de células el aparato de Golgi está organizado en tres regiones funcionalmente distintas: red del *cis*-Golgi, Golgi medio (formado por distintas cisternas o compartimentos) y la red del *trans*-Golgi (TGN) (Hurtley, 1993; Rothman y Orci, 1992). A partir de la TGN, las proteínas se pueden dirigir o a los lisosomas, o a la membrana plasmática y al exterior celular.

En todas las células eucariotas, el transporte de proteínas a través de todos estos compartimentos membranosos intracelulares se realiza mediante vesículas que emergen del compartimento de origen, llevando en su interior o integradas en su membrana las proteínas de interés, y que posteriormente se fusionarán con el siguiente compartimento de la ruta.

Durante su paso a través de la ruta de secreción, cada proteína será, además, modificada postraduccionalmente al adicionársele distintos residuos azucarados por medio de las diferentes enzimas localizadas en cada uno de los compartimentos celulares por los que irá circulando.

2.1. Mutantes de levadura en la ruta de secreción.

Para poder estudiar todos los acontecimientos que tienen lugar durante la secreción de proteínas se han utilizado clásicamente varios tipos de métodos: estrategias genéticas con mutantes de levadura, distintos tipos de ensayos bioquímicos libres de células (en los que se incuban *in vitro* membranas de dos compartimentos de la ruta con componentes de citosol) y ensayos con células de mamífero permeabilizadas.

Schekman y col. (Novick *et al.*, 1980; Novick y Schekman, 1979) construyeron una colección de mutantes termosensibles de *S. cerevisiae* alterados en el proceso de secreción. Estos mutantes pertenecían a 23 grupos de complementación que fueron denominados *sec* de clase A (*sec1*, *sec2*, etc.); a 37°C, no secretaban invertasa ni fosfatasa ácida y, mediante microscopía electrónica, se comprobó que cada uno de ellos acumulaba un tipo de estructuras vesiculares que correspondían al compartimento de la

ruta de secreción anterior al punto en que ésta se encontraba bloqueada en cada mutante. Mediante la caracterización de dobles mutantes, estudiando los orgánulos que se acumulaban y las modificaciones postraduccionales que sufría la invertasa (proteína secretada a través de la ruta) en cada uno de ellos, se pudo establecer tanto el orden en que actuaban los genes mutados como el orden de los orgánulos que intervienen en la secreción y los distintos pasos de maduración que sufría la invertasa (Novick *et al.*, 1981). Se concluyó que las proteínas secretadas en levaduras pasaban por los distintos orgánulos en el mismo orden que se conocía para células superiores: retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi, vesículas de secreción y superficie celular.

Posteriormente, se aislaron los mutantes sec de clase B (*sec53*, *sec59*). Éstos tienen defectos en la ruta de secreción, pero en pasos anteriores a los otros, es decir, en la translocación de las proteínas al interior del RE (Ferro-Novick *et al.*, 1984a; Ferro-Novick *et al.*, 1984). Mediante otros procesos de selección se han identificado mutantes que pertenecen, por lo menos, a 47 grupos de complementación y que están implicados en el transporte de proteínas desde el aparato de Golgi hasta la vacuola (*vps*, "vacuolar protein sorting") (Klionsky *et al.*, 1990).

Mediante la combinación de todos los métodos de estudio de la secreción, se han aportado muchos datos sobre las funciones y regulación de las proteínas codificadas por los genes alterados en esos mutantes, sobre los procesos de formación y posterior fusión de las vesículas implicadas en la secreción, sobre los mecanismos de compartimentalización o selección de las proteínas que deben ir a cada una de las localizaciones celulares, etc. Muchos de los mecanismos implicados en la ruta de secreción son similares en células de mamífero y de levaduras y se han ido comprendiendo gracias a la combinación de los datos que han ido surgiendo en ambos tipos de células.

2.2. Flujo de proteínas a través de la ruta.

Clásicamente se ha considerado que el flujo de proteínas desde el RE hasta la membrana plasmática era constitutivo (exceptuando en el proceso de secreción regulada de mamíferos: introducción, punto 2.5), de manera que todas aquellas proteínas que hubieran entrado en la ruta y no llevaran ningún tipo de señal de retención alcanzarían la superficie o el exterior celular empujadas, simplemente, por este flujo (Rothman y Orci, 1992).

Recientemente, se ha implicado a proteínas de tipo lectina, con dominios transmembranales y localizadas en los compartimentos de la ruta de secreción, en la aceleración del paso a través de la ruta de las proteínas correctamente glicosiladas y en el retraso de las proteínas con modificaciones incorrectas. Según esto, habría distintos tipos de lectinas para detectar las glicosilaciones correctas o incorrectas (Ponnambalam y Banting, 1996) que estarían implicadas en este proceso de control de calidad. El mecanismo sería similar al utilizado en mamíferos para el reconocimiento de las proteínas que se localizan en lisosomas. Estas proteínas están marcadas con residuos de manosa fosforilados (manosa-6-fosfato) que, en el *trans*-Golgi, son reconocidos por un receptor específico. Estos receptores son también proteínas transmembranales que ayudarán a las proteínas marcadas a empaquetarse en las vesículas adecuadas para ser transportadas a los lisosomas (Alberts *et al.*, 1994a).

En los últimos años, también se ha propuesto que algunas proteínas, de las que forman parte del revestimiento de las vesículas que intervienen en la secreción, podrían estar implicadas en mecanismos por los que se seleccionaría la carga de cada una de estas vesículas. De esta manera, en dichas vesículas se empaquetarían preferentemente las proteínas destinadas a continuar la secreción. Aunque se han propuesto distintos modelos (Rothman y Wieland, 1996; Schekman y Orci, 1996), todavía no está claro cual es el mecanismo de selección de la carga de las distintas vesículas; lo que sí parece claro es que, en oposición a lo que se creía clásicamente, el flujo de proteínas a través de la ruta de secreción no es constitutivo.

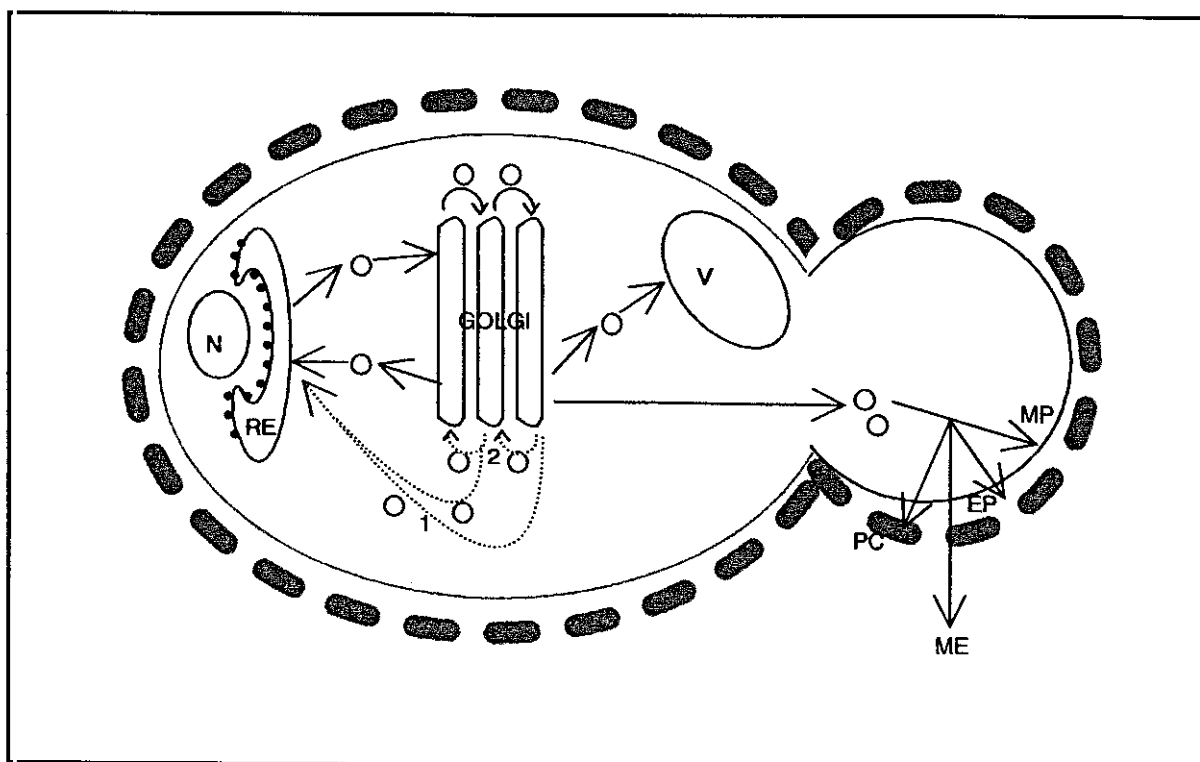


Figura 2. Flujo de vesículas que transportan proteínas a través de la ruta de secreción. Las flechas punteadas representan las posibilidades de flujo desde las distintas cisternas del aparato de Golgi hasta el RE: 1: flujo a través de la comente; 2: flujo contracorrente. N: núcleo; RE: retículo endoplásmico; V: vacuola; MP: membrana plasmática; EP: espacio periplásmico; PC: pared celular; ME: medio externo.

Las proteínas en la ruta de secreción se van moviendo desde el RE hacia adelante y aquellas que finalmente residirán en el RE llegarán, igual que el resto, a la primera cisterna del aparato de Golgi. Las proteínas residentes en RE llevan una señal de 4 aminoácidos en su extremo carboxiterminal (HDEL, His-Arg-Glu-Leu, en levaduras y KDEL, en proteínas del lumen del RE de mamíferos). Esta señal es reconocida por la proteína transmembranal denominada receptor de KDEL (codificada por el gen *ERD2*), que ayudará a que sean transportadas, por medio de vesículas (similares a las del transporte hacia compartimentos posteriores del aparato de Golgi), nuevamente al RE (Pelham, 1991). La existencia de este transporte retrógrado desde la primera cisterna del aparato de Golgi al RE parece clara, y parece que también existe este mismo tipo de transporte entre las distintas cisternas del aparato de Golgi. Este último transporte retrógrado sería necesario para reciclar todas las moléculas que forman la maquinaria de

secreción y se han desplazado hacia compartimentos posteriores al llevar proteínas a éstos. Con este reciclaje, se evitaría el cambio de composición de cada una de las cisternas que forman el aparato de Golgi. Se ha detectado el receptor de KDEL en cisternas del Golgi tardío y se ha comprobado que estas cisternas también tienen la capacidad de reciclar proteínas residentes en RE hacia este. Lo que aún no está tan claro es qué modelo de flujo de los expuestos a continuación se utiliza en este último caso de transporte retrógrado:

① Transporte desde cada cisterna al RE directamente o "flujo a través de la corriente". Sería más rápido para recuperar las proteínas en el RE, pero no reciclaría los componentes de cada cisterna del Golgi.

② Transporte desde cada cisterna a la anterior en la ruta o "flujo contracorriente". En este caso sí que se reciclarían los componentes de cada cisterna.

También es posible que existan los dos tipos de flujo (Rothman y Wieland, 1996) (ver figura 2).

Sobre los mecanismos implicados en la localización de las proteínas residentes en el aparato de Golgi se conocen pocos datos. Recientemente, se ha propuesto que en la localización de una proteína del Golgi tardío (dipeptidil aminopeptidasa A) intervienen dos mecanismos distintos: uno por el cual el motivo FFXD (Phe-X-Phe-X-Asp) dirige su retorno desde compartimentos posteriores a Golgi y otro que retarda la salida de dicha proteína del aparato de Golgi (Bryant y Stevens, 1997).

2.3. Distintos pasos de la ruta de secreción.

2.3.1. Translocación de las proteínas al retículo endoplásmico y modificaciones sufridas en éste.

El primer acontecimiento que tiene lugar en el proceso de secreción de proteínas es la **translocación** o entrada de proteínas en el lumen del RE. Ésta puede llevarse a cabo al mismo tiempo que se realiza la traducción (**co-traduccion**) o posteriormente a ella (**post-traduccion**).

Cuando la translocación es **co-traduccion**, la secuencia señal (que debe existir en el polipéptido que se está sintetizando para que entre en la ruta de secreción) es reconocida por una molécula llamada partícula de reconocimiento de la señal (SRP) (Hann y Walter, 1991). La SRP dirigirá al ribosoma hacia el RE donde, con la mediación de un receptor para esta molécula, distintos complejos proteicos y GTP, el polipéptido atravesará un canal de la membrana. La síntesis de la proteína continuará a la vez que se internaliza en el RE, donde finalmente se liberará el péptido señal. Probablemente, el mayor constituyente del canal transmembranal será el llamado complejo Sec61p (formado por Sec61p, Sbh1p y Ss1p) (Rapoport *et al.*, 1996). En la translocación **post-traduccion** no interviene la SRP y los factores citosólicos implicados en ella no se han descrito todavía, aunque la proteína Hsp70 ("heat shock protein 70") podría actuar manteniendo el polipéptido sin plegar antes de que se produzca la translocación. Sin embargo, sí se ha descrito la intervención de un complejo de siete proteínas transmembranales formado por los subcomplejos Sec61p y Sec62/Sec63p (Sec62p, Sec63p, Sec71p y Sec72p). La

proteína Kar2p (ATPasa de la familia de las chaperoninas Hsp70 y relacionada también con la cariogamia, equivalente a BiP de mamíferos) se localiza en el lumen del RE y también es importante en este proceso (Rapoport *et al.*, 1996). Schekman y col. (Brodsky *et al.*, 1995) describen que Kar2p y Sec63p son necesarias además en la translocación co-traduccional, a pesar de que esto no se hubiera detectado en estudios anteriores (Görlich y Rapoport, 1993). Una de las proteínas que se comentará posteriormente por estar relacionada con Sec14p, Sac1p, se ha implicado recientemente en el proceso de transporte de ATP necesario para la translocación al interior del RE (Mayinger *et al.*, 1995).

Durante o después de la translocación al interior del RE las proteínas sufren una o varias modificaciones de su estructura: a) una de las proteínas residentes en el RE es PDI (de "protein disulfide isomerase") que catalizará la formación de puentes disulfuro entre grupos sulfhidrilo (SH) de cisteínas de las proteínas que entran en este compartimento; b) Kar2p (BiP en mamíferos) también se localiza en RE y, además de la función mencionada anteriormente, reconoce las proteínas incorrectamente plegadas evitando que continúen el camino hacia otros compartimentos celulares y es posible que también las ayude a plegarse correctamente (Hurtley, 1993); c) la mayoría de las proteínas que entran en RE son glicosiladas por primera vez en su interior, mediante la adición a determinados residuos de Asn (N-glicosilación) de un oligosacárido que comprende la llamada "región central" (dos residuos de N-acetilglucosamina y tres de manosa) y otros residuos de glucosa y manosa; d) a las proteínas que contienen el extremo carboxiterminal transmembranal y una señal determinada, este extremo se les cambia por una unión covalente a un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclado en membrana (Alberts *et al.*, 1994).

Mientras las reacciones iniciales del proceso de N-glicosilación son similares en todas las células eucariotas, la O-glicosilación es diferente en mamíferos y en levaduras. Dicha O-glicosilación consiste en la adición de distintos azúcares a grupos hidroxilos de determinados residuos de serina o treonina en algunas proteínas. En levaduras, la adición del primer residuo manosil a estos aminoácidos se produce en el RE (Tanner y Lehle, 1987), mientras que en mamíferos este proceso comienza en el aparato de Golgi.

2.3.2. Movimiento desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi. Mecanismo de emergencia y fusión de vesículas.

El proceso de emergencia de las vesículas, que intervienen en el transporte de las proteínas a través de la ruta de secreción, desde la membrana de origen es bastante complejo. Así como, también lo son los procesos de marcaje de estas vesículas para que se fusionen con el compartimento posterior adecuado y de fusión con las membranas de este compartimento aceptor. En concreto, en estos procesos de transferencia del RE al Golgi están implicadas las proteínas codificadas, al menos, por 18 genes (Wuestehube *et al.*, 1996).

Las vesículas del transporte de proteínas están revestidas por subunidades de proteínas citosólicas que se van uniendo a la membrana donadora y ayudan a ésta a emerger para formar la vesícula. En general, se conocen cuatro tipos de revestimiento: dos formados por proteínas llamadas clatrin ("clathrin") que intervienen, por ejemplo, en endocitosis y otros dos, cuyas cubiertas tienen otros tipos de proteínas citosólicas y forman las vesículas de tipo COPI y COPII (Rothman y Wieland, 1996; Schekman y Orci, 1996) (ver tabla II).

Tabla II. Características principales de las vesículas de transporte tipo COPI y COPII.

Tipo de vesículas	Subunidades del revestimiento	Proteínas identificadas en las subunidades	GTPasa	Origen-destino
COPI	Cubierta ("coatmer")	Sec21p, Sec26p, Sec27p, Ret1p, ARF	ARF	RE-Golgi, bidireccional en Golgi, Golgi-RE
COPII	Complejos de proteínas tipo COPII	Sec31p, Sec13p, Sec23p, Sec24p, Sec16p, Sar1p	Sar1p	RE-Golgi

En la transición del RE al aparato de Golgi se producen vesículas de tipo COPII. El proceso de formación y posterior fusión de estas vesículas de secreción es similar, pero con la intervención de distintas proteínas, al que ocurre en las vesículas de tipo COPI y que se representa en la figura 3. En el caso de la formación de vesículas tipo COPII, el proceso es controlado por una proteína citosólica del tipo de proteínas pequeñas de unión a GTP, Sar1p, la cual en citosol se encuentra unida a GDP. El producto del gen *SEC12*, localizado en RE, cataliza el recambio del GDP de Sar1p por GTP (Barlowe y Schekman, 1993) y la molécula de Sar1p-GTP dispara el proceso de emergencia de la vesícula (Nakano y Muramatsu, 1989). Para esto, Sar1p-GTP se une a la membrana de RE que permanecía plana y recluta subunidades de las proteínas de revestimiento (proteínas de tipo COPII) con las que se ensamblará y formará cubiertas esféricas que harán emerger la vesícula (Rothman y Orci, 1992). Después de esto se produce la fusión real entre dos zonas de la membrana (también requiere cofactores) que lleva a la formación total de la vesícula. Cuando el GTP es hidrolizado por Sar1p activada por Sec23p (proteína activadora de la actividad GTPasa Sar1p específica) se libera fosfato y Sar1p se separa de la vesícula; esto, posteriormente, provocará la disociación de las proteínas que la recubren y, más tarde, se iniciará el proceso de fusión de vesícula con la membrana aceptora. En la cubierta de estas vesículas de tipo COPII se han identificado las siguientes proteínas: Sar1p, el complejo Sec23p (formado por Sec23p y Sec24p), el complejo Sec13p (formado por Sec13p y Sec31p) (Salama y Schekman, 1995), y la proteína Sec16p que también interacciona con Sec23p (Espenshade *et al.*, 1995). Asimismo, se ha determinado que el producto del gen *SED4*, una proteína integral de membrana de RE, está relacionado con Sec16p y participa en la formación de estas vesículas (Gimeno *et al.*, 1995).

Para que cada vesícula vaya al compartimento siguiente de la ruta de secreción y no se fusione con otro orgánulo diferente, tanto las vesículas como las membranas receptoras están marcadas con proteínas llamadas SNAREs (Söllner *et al.*, 1993). Éstas son proteínas integrales de membrana con dominios aminoterminales citoplásmicos. Hay dos tipos de estas proteínas: v-SNAREs (están en las vesículas y en las membranas donadoras de las que provienen) y t-SNAREs (están en la membrana aceptora). Las v-SNAREs reconocerán a las t-SNAREs de la membrana aceptora a la que se dirige la vesícula, sus dominios citoplásmicos se unirán y, a partir de ahí, se iniciará el mecanismo de fusión de la membrana de la vesícula con la membrana del compartimento aceptor (ver figura 3) (Hurtley, 1993). Las proteínas pertenecientes a cada uno de los dos tipos (v y t-SNAREs) tienen que ser lo bastante distintas entre sí como para que exista especificidad en cada paso de la ruta de secreción y lo bastante parecidas como para que las proteínas implicadas en el mecanismo de fusión de vesículas que sean comunes en distintos pasos puedan reconocerlas a todas. Las v-SNAREs de las vesículas originadas en RE están codificadas por los genes *BOS1* (Lian y Ferro-Novick, 1993), *BET1* y *SEC22* y la t-SNARE en el aparato de Golgi por *SED5* (Rothman, 1994).

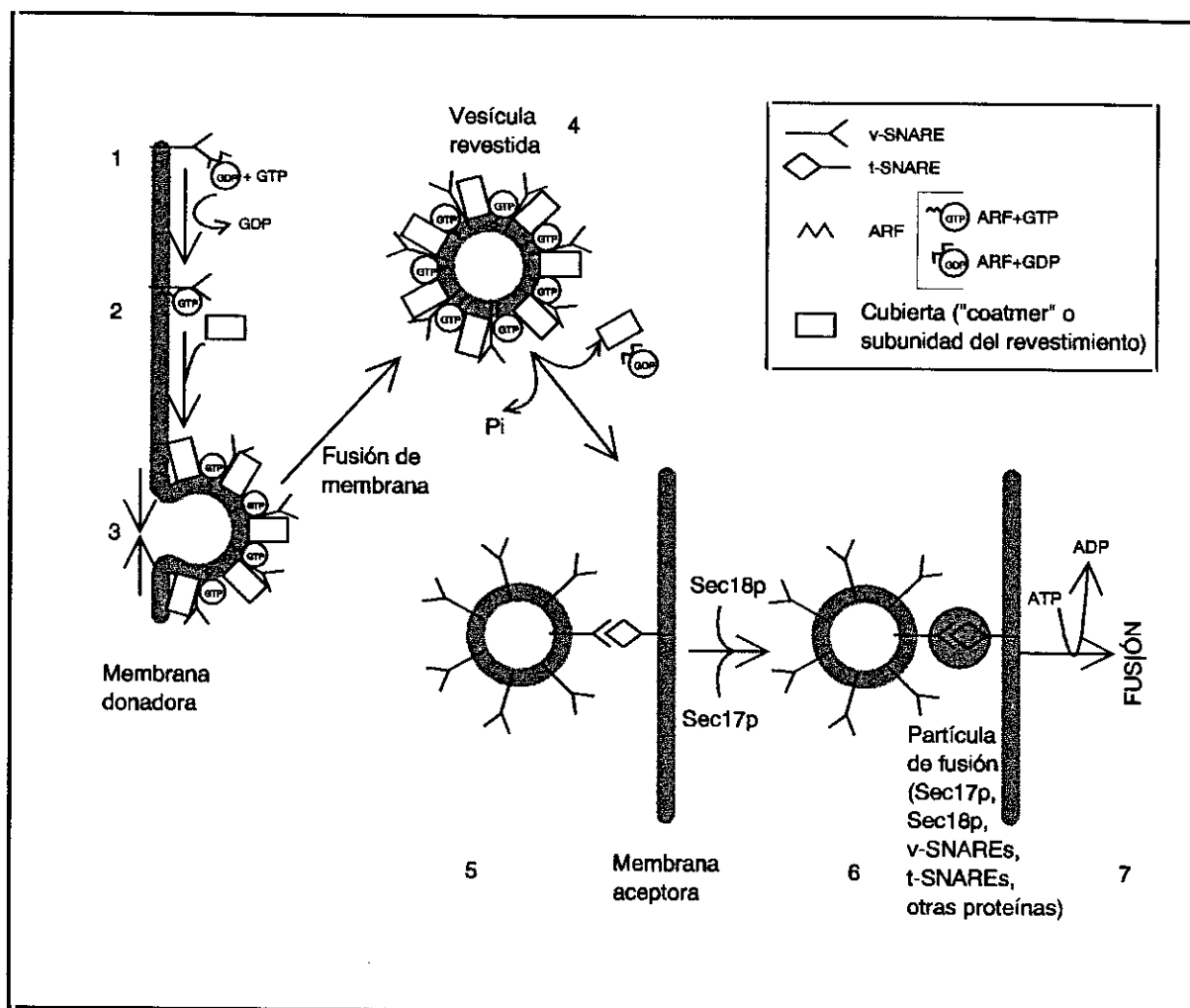


Figura 3. Distintos pasos del mecanismo molecular general de la emergencia y fusión de vesículas transportadoras de proteínas de tipo COPII entre distintos compartimentos de la ruta de secreción. Para detalles, ver el texto. En las vesículas de tipo COPII, utilizadas en el transporte desde el RE al aparato de Golgi, Sar1p actúa en lugar de ARF y su revestimiento está formado por subunidades diferentes a la cubierta o "coatmer" (ver también tabla II).

Una vez que se ha producido el proceso de disociación del revestimiento de la vesícula, las v-SNAREs quedan expuestas al citoplasma y pueden reconocer a las t-SNAREs del compartimento al que se dirige dicha vesícula. Al unirse estas dos proteínas se forma el complejo SNARE. Se cree que esta unión está promovida por GTPasas pequeñas del tipo Rab, distintas en cada paso de la secreción. Entre ellas, Ypt1p es la que actúa en el paso entre RE y Golgi (Lian *et al.*, 1994). Después de la formación del complejo SNARE, se le unirán a éste las proteínas implicadas en la maquinaria de fusión, formando la denominada partícula de fusión. Entre éstas se encuentran Sec18p (proteína con actividad ATPasa, equivalente a NSF de mamíferos) y Sec17p (equivalente a α -SNAP de mamíferos). La hidrólisis de ATP producida por Sec18p produce la ruptura del complejo SNARE y se inicia la fusión entre membranas. Se necesitan proteínas adicionales para completar la partícula de fusión, como Sly1p (que pertenece a la familia de las Rabs) (Ferro-Novick y Jahn, 1994) y es posible que alguna más. Esta maquinaria de fusión está muy conservada a lo largo de los distintos pasos de la ruta de secreción.

Así, en todos los procesos de fusión de vesículas de esta ruta es necesaria la intervención de Sec18p (Graham y Erm, 1991) y de Sec17p. El resto de las proteínas implicadas en esta maquinaria de fusión, aunque no son las mismas, sí que pertenecen a la misma familia (figura 4). Este mecanismo parece estar conservado incluso entre levaduras y neuronas (Bennett, 1995; Bennett y Scheller, 1993; Ferro-Novick y Jahn, 1994).

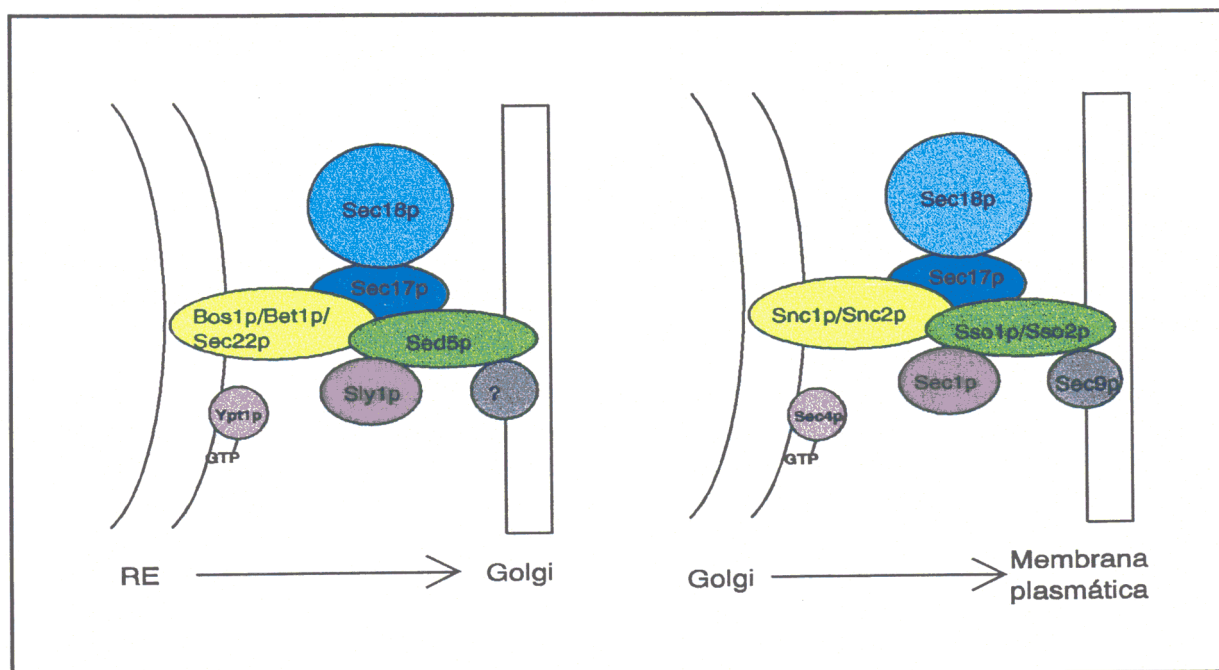


Figura 4. Conservación del mecanismo de fusión de vesículas en distintos pasos de la ruta de secreción de proteínas en levaduras. Las proteínas iguales o de la misma familia están representadas en el mismo color. Adaptada de Ferro-Novick y Jahn (Ferro-Novick y Jahn, 1994).

El transporte retrógrado desde el Golgi al RE parece que se realiza mediante vesículas de tipo COPI. Los mecanismos de formación y fusión que se utilizan son, en términos generales, similares a los descritos para las vesículas de tipo COPII (ver figura 3). Las únicas diferencias remarcables son que la proteína de unión a GTP que regula la formación de estas vesículas es, en lugar de Sar1p, el factor de ribosilación de ADP (ARF) y dichas vesículas se revisten por un complejo formado por subunidades a las que vamos a denominar cubierta ("coatmer"). Cada cubierta o subunidad del complejo está formado por siete proteínas, entre las que se encuentran, además de ARF, los productos de los genes *SEC21*, *SEC26*, *SEC27* y *RET1* (ver tabla II). Parece que las vesículas de tipo COPI también son utilizadas, además de las de tipo COPII, en el transporte de RE a Golgi llevando en su interior distintos tipos de proteínas (Pelham, 1994; Salama y Schekman, 1995). Schekman y Orci (Schekman y Orci, 1996) proponen que cada uno de estos tipos de vesículas podría tener una función distinta. Así, las vesículas de tipo COPII estarían encargadas del transporte de la mayoría de las proteínas desde el RE al aparato de Golgi. Sin embargo, las vesículas de tipo COPI se encargarían del transporte retrógrado de las proteínas residentes en RE desde el aparato de Golgi hasta dicho RE. Estas vesículas de tipo COPI, además, serían las encargadas de reciclar (desde el RE hasta el aparato de Golgi) las proteínas necesarias para que el mencionado transporte retrógrado se pueda seguir llevando a cabo. En este último caso, sería cuando las vesículas COPI llevarían la misma dirección que las de tipo COPII.

Además de todos los genes mencionados, también se han implicado algunos otros, cuya función no está muy clara, en el transporte de proteínas de RE al aparato de Golgi: *BET2*, *SEC20*, *TIP1*, *USO1*.

2.3.3. Paso de las proteínas a través del aparato de Golgi y su clasificación hacia distintas localizaciones finales.

El paso de las proteínas a través de las distintas cisternas del aparato de Golgi se realiza, al menos en mamíferos, mediante vesículas tipo COPI. Éstas van transportando las proteínas del Golgi temprano al Golgi medio y, desde éste al Golgi tardío (Rothman y Wieland, 1996). Como ya se ha comentado, la proteína que activa la formación de este tipo de vesículas es ARF y éstas se revisten de un conjunto de proteínas (cubierta o "coatmer") (Orci *et al.*, 1993) (ver figura 3 y tabla II).

No se conocen muchos datos de proteínas que puedan ser específicas del transporte de proteínas entre las distintas cisternas del aparato de Golgi. Recientemente, en levaduras, se ha implicado a dos GTPasas de la familia Rab homólogas a Ypt1p, Ypt31p y Ypt32p, en el transporte intra-Golgi o en la formación de vesículas a partir del Golgi tardío (Benli *et al.*, 1996). También han sido identificadas dos proteínas relacionadas genéticamente con Sed5p (t-SNARE situada en Golgi), Sft1p y Sft2p. Se han propuesto dos posibles papeles para Sft1p que concuerdan con las propiedades de SNARE que presenta: ① podría actuar como v-SNARE de vesículas de transporte retrógrado que reciclen compuestos desde compartimentos posteriores del Golgi hasta las primeras cisternas de este mismo orgánulo, donde Sed5p actuaría de t-SNARE en este paso o ② podría cooperar con Sed5p como t-SNARE en ese mismo paso de transporte retrógrado (Banfield *et al.*, 1995).

Hay que destacar que últimamente se ha apuntado la idea de que lípidos derivados del fosfatidilinositol, el ácido fosfatídico y la fosfolipasa D (PLD) pueden tener un papel crucial en el mecanismo de emergencia de vesículas en el aparato de Golgi. El descubrimiento de que ARF es un potente activador de la fosfolipasa D (PLD) en presencia de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) como cofactor (Brown *et al.*, 1993; Cockcroft *et al.*, 1994), ha llevado a estudiar el papel de esta enzima en la regulación de la formación de vesículas de secreción. La PLD hidroliza fosfatidilcolina (PC) liberando ácido fosfatídico (PA) y colina. Se ha propuesto que la liberación del ácido fosfatídico en zonas de membrana donde exista PIP_2 cercano (PA y PIP_2 son lípidos cargados muy negativamente) podría facilitar la unión de las proteínas de la cubierta a un posible receptor de éstas y/o ayudar en el paso de una membrana plana a curvada. Según este modelo, la función del ARF sería únicamente activar a la PLD para que se libere el PA necesario, ya que se ha comprobado que, en líneas celulares con esta PLD activada constitutivamente, ARF no se necesita para la emergencia de vesículas (Ktistakis *et al.*, 1996).

Además, están surgiendo datos que apuntan a que los distintos derivados fosforilados del fosfatidilinositol (PI) juegan un papel crucial en la regulación del transporte de vesículas. Se ha visto que estos compuestos pueden interaccionar tanto con las GTPasas implicadas en la regulación de estos procesos como con otras proteínas del revestimiento de las vesículas. Se cree que la fosforilación y defosforilación del anillo de inositol podría ser la clave de la regulación del tráfico de membranas. Así, algunos los derivados surgidos de esta fosforilación, podrían tener la capacidad de reclutar proteínas del revestimiento de las vesículas, mientras que otros carecerían de dicha capacidad.

Asimismo, determinados derivados podrían activar a las proteínas regulatorias de los distintos pasos de la ruta de secreción (De Camilli *et al.*, 1996).

Durante su paso a través de las cisternas del aparato de Golgi, los residuos azucarados de las proteínas N-glicosiladas van siendo modificados, de diferentes maneras según la proteína, por las distintas enzimas de cada una de las cisternas: se eliminan residuos de manosa y se adicionan residuos de N-acetilglucosamina, galactosa y ácidos siálicos. Otro tipo de modificación que pueden sufrir las proteínas a su paso por este orgánulo es la O-glicosilación. Ésta, en mamíferos, comienza en el aparato de Golgi y normalmente, primero se une N-acetilgalactosamina y luego un número indeterminado de residuos azucarados (Alberts *et al.*, 1994a). En levaduras, la O-glicosilación comienza en el RE, mientras en el aparato de Golgi se producen elongaciones posteriores de las cadenas laterales de las proteínas O-glicosiladas (Tanner y Lehle, 1987).

Una vez atravesadas todas las vesículas del aparato de Golgi, las proteínas se dirigen desde el Golgi tardío a sus localizaciones finales en la célula. En el Golgi tardío se pueden formar distintos tipos de vesículas. Vesículas de un tipo transportarán proteínas a la vacuola (o a lisosomas en mamíferos) y las de otro tipo se fusionarán con la membrana plasmática y portarán las proteínas que se dirijan a esta membrana, al espacio periplásmico, a la pared celular o al exterior de la célula. Dentro de este segundo tipo, recientemente se han identificado dos poblaciones de vesículas que contienen proteínas diferentes, sugiriendo la existencia de dos rutas paralelas, de vesículas de secreción, desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática (Harsay y Bretscher, 1995). Por todo ello, las últimas cisternas del aparato de Golgi deben tener la capacidad para separar correctamente las proteínas que serán transportadas a cada una de las mencionadas localizaciones. Los únicos mutantes *sec* defectivos en la formación de las vesículas de secreción que van desde el aparato de Golgi hasta la membrana citoplásmica son los mutantes *sec14* (comentados ampliamente en el punto 3 de la introducción) y *sec7* (Novick *et al.*, 1980).

2.3.4. Fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática: exocitosis.

Estudios genéticos han implicado, al menos, a 14 genes en el proceso de fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática. En éste, existe una partícula de fusión similar a la del proceso de fusión de las vesículas derivadas del RE con el aparato de Golgi. Sec4p es la GTPasa homóloga a Ypt1p que desencadenará la fusión. En la partícula de fusión, además de Sec17p y Sec18p, se encuentran las proteínas específicas de este paso de la ruta: Sec1p (proteína Rab, homóloga a Sly1p); Snc1p y Snc2p, que son las v-SNAREs; Sso1p y Sso2p, que son las t-SNAREs y Sec9p (Ferro-Novick y Jahn, 1994). No se han encontrado homólogos de esta última proteína en los otros pasos de fusión de vesículas en *S. cerevisiae*, pero es homóloga a SNAP25, una proteína que interviene en la fusión de las vesículas presinápticas con la membrana plasmática de neuronas y, al igual que SNAP25, Sec9p se sitúa en la membrana plasmática (Brennwald *et al.*, 1994) (figura 4).

También intervienen específicamente en este paso de la ruta otras proteínas de las que no se conoce exactamente su función: Sec2p (proteína con un dominio superenrollado) (Nair *et al.*, 1990), Scd5p, y otras siete (Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p) que recientemente se ha descrito que forman un complejo multiproteico

al que se ha denominado "exociste" (de "exocyst") por ser necesario únicamente para la exocitosis (TerBush *et al.*, 1996).

Una vez que se produce el proceso de fusión de vesículas con la membrana plasmática, las proteínas que éstas transportaban alcanzarán sus localizaciones finales. Estas localizaciones pueden ser la membrana plasmática o el exterior celular en cualquier célula eucariota y, en levaduras, además, la pared celular o el espacio periplásmico.

2.4. Genes descritos de *C. albicans* relacionados con la secreción.

Hasta la fecha, existen muy pocos datos sobre los mecanismos implicados en el proceso de secreción en *C. albicans*, aunque se supone que son muy parecidos a los de *S. cerevisiae*. Anteriormente a este trabajo, solamente se habían clonado los siguientes genes relacionados con este proceso: *SEC18*, *ARF*, *PMM1*, *PMI1* y un fragmento, todavía sin caracterizar en profundidad, que es capaz de complementar el mutante *sec61* (de la Rosa *et al.*, 1996). Los productos de los genes *PMM1* y *PMI1* no se encuentran en la ruta de secreción de proteínas, pero por estar implicados en la síntesis de la manosa que será utilizada para la glicosilación de las proteínas en el RE, su defecto produce cepas con problemas de secreción y glicosilación.

El gen *SEC18* se clonó por complementación funcional del mutante *sec18-1* de *S. cerevisiae*. La proteína deducida, Sec18p, es homóloga tanto a Sec18p de *S. cerevisiae* como a NSF de mamíferos y presenta, como ellas, un posible sitio de unión a ATP (Nieto *et al.*, 1993).

El gen *ARF*, clonado mediante hibridación DNA-DNA, es muy parecido a sus homólogos de otras especies. La proteína que codifica comparte 78 % y 77 % de identidad con las proteínas de levadura codificadas por los genes *ARF1* y *ARF2*, respectivamente, y 83 %, 82 % y 77 % con las codificadas por los genes *ARF1*, *ARF3* y *ARF4* humanos. Al igual que ocurre en otras especies, se ha detectado la presencia de un segundo gen *ARF* en el genoma de *C. albicans* (Denich *et al.*, 1992).

También por medio de hibridación se clonó el homólogo de *C. albicans* al gen *SEC53* de *S. cerevisiae*. Este gen, denominado *PMM1*, codifica la enzima fosfomanosa mutasa de *C. albicans* (implicada en glicosilación de proteínas) y complementa el mutante *sec53-6* de levadura (Smith *et al.*, 1992). El gen *PMI1* de *C. albicans* que codifica la enzima fosfomanosa isomerasa se clonó de igual forma que los anteriores. Este gen es capaz de complementar los defectos de un mutante de *S. cerevisiae* en el gen homólogo y la proteína que codifica comparte una identidad de 64,1 % con su homóloga de *S. cerevisiae*. La delección de ambas copias de *PMI1* en *C. albicans* produce estirpes auxótrofas para manosa (Smith *et al.*, 1995).

Mediante el proyecto de secuenciación del genoma de *C. albicans* se está detectando continuamente la existencia, en el genoma de este organismo, de otros genes implicados en los procesos de secreción, como son: *SEC4*, *SEC7* y *SAR1*.

2.5. Secreción constitutiva y regulada en mamíferos.

En mamíferos, además del proceso de secreción constitutiva similar al de levaduras comentado a lo largo de este punto, también existe un proceso de secreción regulada. Mediante este último, ciertas proteínas, en células especializadas, se secretan al exterior celular en respuesta a un estímulo determinado. En este proceso, las proteínas siguen un camino por la ruta de secreción paralelo al de las proteínas secretadas constitutivamente pero, a partir del *trans*-Golgi, se forman unos gránulos de secreción especialmente densos. Éstos permanecen cerca de la membrana plasmática hasta que reciben una señal extracelular que impulsa su fusión con esta membrana y la liberación de su contenido al exterior celular. El mecanismo molecular por el cual se impulsa a los gránulos de secreción hacia la membrana plasmática es muy poco conocido, pero se ha dividido en dos pasos secuenciales: el primero, que se denomina cebado ("priming"), es dependiente de ATP y Mg^{2+} y el segundo, que se llama disparo ("triggering"), depende de Ca^{2+} . Ambos pasos necesitan además distintos factores citosólicos (Hay y Martin, 1992).

3. PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE FOSFATIDILINOSITOL.

3.1. Gen *SEC14* y proteína Sec14p de *S. cerevisiae*.

Algunos de los mutantes *sec* de *S. cerevisiae* obtenidos por Schekman y col. (Novick *et al.*, 1980) pertenecen al grupo de complementación *sec14*. En estos mutantes, al igual que en los del grupo de complementación *sec7*, se observa por microscopía electrónica, a la temperatura no permisiva, un acumulo de estructuras sin parecido con ninguna otra de las descubiertas hasta el momento de su descripción. Éstas se denominaron cuerpos de Berkeley y consisten principalmente en dos membranas curvadas con un lumen transparente a los electrones. En *sec14*, además, también se forman vesículas de 80-100 nm, que pueden detectarse asimismo en otros grupos de complementación. El establecimiento del orden de los hechos ocurridos en el proceso de secreción de proteínas permitió concluir que, en el mutante *sec14*, esta ruta se encuentra bloqueada en el paso entre el aparato de Golgi y las vesículas de secreción que posteriormente se fusionarán con la membrana plasmática (Novick *et al.*, 1981).

3.1.1. Clonación y características del gen *SEC14* y de Sec14p.

Para profundizar en el estudio de la intervención directa o indirecta de Sec14p en la secreción de proteínas, se estudiaron tanto el mutante termosensible como el gen que se encuentra alterado en él. El hecho de que el bloqueo de la secreción de invertasa en el mutante *sec14* termosensible sea un proceso muy drástico y con una rápida cinética parece indicar un defecto primario en este proceso de secreción. Esto implica a la proteína Sec14p directamente en la ruta de secreción de proteínas (Bankaitis *et al.*, 1989).

La clonación del gen *SEC14* de *S. cerevisiae* se realizó mediante complementación funcional del fenotipo termosensible del mutante *sec14*. La

secuenciación de dicho gen reveló que tenía un intrón y codificaba un polipéptido de 304 aa, con una masa molecular aparente de 35 kDa y sin señales obvias de inserción en membrana ni de entrada en la ruta de secreción de proteínas. Estos datos concuerdan con que Sec14p, por medio de anticuerpos, se identificó como un polipéptido no glicosilado de 37 kDa, y que se encuentra en la fracción citosólica de *S. cerevisiae* (Bankaitis *et al.*, 1989). Esta proteína se ha identificado también en mapas bidimensionales de extractos celulares totales de *S. cerevisiae*, donde se localiza con un peso molecular de 37 kDa y un punto isoelectrico de 5,4 (Garrels *et al.*, 1995). El descubrimiento de que se trata de un gen esencial para el crecimiento de la levadura permitió describirlo como un factor citosólico necesario para el tráfico de proteínas a partir del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática. Posteriormente, se describió que Sec14p colocalizaba con el marcador de aparato de Golgi de levaduras Kex2p *in vivo*, dato que indicaba una asociación real de la proteína con las membranas de este orgánulo celular (Cleves *et al.*, 1991).

La proteína Sec14p de *S. cerevisiae* es bastante abundante (Bankaitis *et al.*, 1989; Kagiwada *et al.*, 1996) y hasta el momento no se conoce que su expresión esté sometida a ningún tipo de regulación. No se han detectado cambios periódicos en los niveles de mRNA de *SEC14* que correspondan a diferentes estados del ciclo celular, ni a cambios significativos en condiciones de bloqueo de la endocitosis o la secreción celular, así como tampoco en condiciones de inducción de la actividad secretora (Vahlensieck *et al.*, 1995). Su expresión no se encuentra tampoco sujeta a represión por la presencia en el medio de cultivo de sustancias relacionadas con su función, como pueden ser inositol y colina. Por todo ello, la expresión de este gen ha sido descrita como constitutiva (Kagiwada *et al.*, 1996).

Un descubrimiento que aportó una luz nueva en el estudio de la actividad de Sec14p fue la observación de que su secuencia aminoacídica era idéntica a la obtenida de la proteína de transferencia de fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilcolina (PC) purificada de extractos de *S. cerevisiae* (Aitken *et al.*, 1990; Bankaitis *et al.*, 1990). Tras corroborar que, efectivamente, se trataba del mismo gen y que el defecto de los mutantes *sec14* era debido a la incapacidad de esas células para movilizar fosfatidilinositol o fosfatidilcolina, se estableció por primera vez una función *in vivo* a una proteína de transferencia de fosfatidilinositol. Hasta ese momento se habían atribuido funciones a este tipo de proteínas que concordaban con su actividad bioquímica *in vitro*, pero no se conocía realmente que funciones podrían desempeñar dentro de la célula. Curiosamente, esta proteína no presenta ninguna homología de secuencia con las proteínas de transferencia de fosfatidilinositol de células de mamífero, las cuales habían sido ampliamente estudiadas *in vitro* desde el punto de vista bioquímico.

3.1.2. Función de la proteína Sec14p: actividad bioquímica y posibles papeles fisiológicos.

Las proteínas de transferencia de fosfolípidos se encuentran en todas las células eucariotas e incluso en algunas bacterias. Por su capacidad *in vitro* de intercambiar fosfolípidos entre dos bicapas lipídicas artificiales o naturales, clásicamente, se les ha asignado un papel importante en el movimiento intracelular de fosfolípidos. Este tipo de proteínas se caracteriza por su capacidad de transferir PI y PC, presentando mayor afinidad por el PI (por lo que se suelen denominar proteínas de transferencia de PI, PITPs). De su papel *in vivo* se conocían muy pocos datos (Dowhan, 1991), de ahí que el descubrimiento de que la única proteína de transferencia de PI/PC existente en la

levadura interviene en la ruta de secreción de proteínas abrió una vía de investigación importante para hallar la función real de esta proteína *in vivo* (Aitken *et al.*, 1990).

3.1.2.1. Funciones atribuidas a Sec14p en relación a su actividad *in vitro*.

La localización de las enzimas de la biosíntesis de fosfolípidos está restringida a distintos compartimentos intracelulares (la mayoría en el RE y en la membrana mitocondrial interna) y la necesidad de todas las membranas subcelulares de tener una composición lipídica determinada implica la existencia de mecanismos que regulen la distribución de los fosfolípidos de nueva síntesis. Estos mecanismos pueden ser (Kohlwein *et al.*, 1996):

- Difusión espontánea a través de un compartimento acuoso (sólo posible en algunos tipos de lípidos, ej: ácido lisofosfatídico).
- Transporte catalizado por proteínas de transferencia de fosfolípidos (PITP).
- Flujo de vesículas que liberen parte del material de una membrana donadora en una membrana aceptora. Por ejemplo, el transporte de esfingolípidos a la membrana plasmática depende estrictamente del tráfico de vesículas a través de la ruta de secreción (Hechtberger y Daum, 1995; Kohlwein *et al.*, 1996; Puoti *et al.*, 1991).
- Contacto directo entre membranas que permita la difusión de lípidos de un compartimento hidrofóbico a otro. En levaduras se ha descrito que, al igual que en mamíferos, existe una fracción de membrana del retículo endoplásmico que parece interaccionar con la membrana externa de la mitocondria. A esta fracción se le denomina MAM o membrana asociada a mitocondria y presenta gran capacidad de sintetizar PI y fosfatidilserina (PS). Esta PS, a través del contacto directo entre membranas, se internaliza en la mitocondria y allí se descarboxila transformándose en fosfatidiletanolamina (Alb *et al.*, 1996; Gaigg *et al.*, 1995; Kohlwein *et al.*, 1996).

El segundo mecanismo mencionado, que implica a las PITPs como catalizadoras del transporte de lípidos entre membranas, constituía el papel asignado *in vivo* a estas proteínas durante muchos años (Cleves *et al.*, 1991a; Wirtz, 1991). No sólo no existe ninguna evidencia de que este tipo de mecanismo de transporte lipídico tenga lugar *in vivo* (Dowhan, 1991; Kohlwein *et al.*, 1996), sino que se ha comprobado, mediante estudios sobre los mutantes *sec14^{ts}*, que Sec14p (PITP) no está implicada en el transporte de PI y PC desde membranas intracelulares a la membrana plasmática (Gnamusch *et al.*, 1992).

Para comprobar si la capacidad de transferencia de lípidos demostrada por Sec14p *in vitro* correspondía con el reflejo de alguna propiedad que necesita esta proteína para realizar su función *in vivo* (aunque su función celular no sea el transporte de lípidos "per se"), Skinner y col. (Skinner *et al.*, 1993) trataron de comprobar si una proteína de mamíferos que presentara *in vitro* la misma capacidad de transferencia de PI y PC podía restituir los defectos de crecimiento presentados por un mutante *sec14^{ts}* de levadura. Para esto, eligieron la isoforma α de la PITP de rata (PITP α) (Dickenson *et al.*, 1989). El hecho de que la secuencia de las proteínas PITP α s de mamífero no comparta homología con Sec14p facilitaría el poder relacionar los resultados que se obtuvieran únicamente con la propiedad común de transferir lípidos que Sec14p y PITP α presentan *in vitro*. La

expresión de PITP α de rata en *S. cerevisiae* puede complementar los defectos de crecimiento y de secreción de un mutante *sec14^{ts}*, mientras que no es capaz de hacer lo mismo en un mutante *sec14* interrumpido. Esta falta de complementación parece estar relacionada con la incapacidad de la proteína de mamíferos para unirse de manera estable al aparato de Golgi. De estos datos se deduce que la actividad de transferencia de fosfolípidos es necesaria, pero no suficiente, para la función de Sec14p *in vivo*. Parece que la localización en el Golgi es otra característica esencial para el papel de esta proteína en la levadura (Skinner *et al.*, 1993). Estos autores también sugieren que la asociación estable de Sec14p con las membranas del aparato de Golgi no es el resultado de su capacidad de unir lípidos y que los 129 residuos aminoterminales de Sec14p son suficientes para dirigir una forma catalíticamente inactiva de la proteína de rata PITP α al aparato de Golgi.

3.1.2.2. Mutaciones supresoras de la mutación *sec14^{ts}* en *S. cerevisiae*.

Las mutaciones termosensibles descritas en el gen *SEC14* son todas producidas por la transición de G a A que convierte el codón 266 de GGT (Gly) en GAT (Asp) (Cleves *et al.*, 1991; Cleves *et al.*, 1989). Esta mutación se llamó *sec14-1^{ts}*. En la búsqueda de genes relacionados con *SEC14*, y con el objetivo final de aportar nuevos datos sobre su papel real en la secreción de proteínas, Cleves y col. seleccionaron mutaciones espontáneas que fueran capaces de revertir el fenotipo termosensible producido por la mencionada mutación. Defectos en, al menos, siete genes son capaces de producir esa supresión fenotípica de la termosensibilidad; de éstos, seis fueron detectados mediante la mencionada estrategia. Estos genes son: **SAC1** (Cleves *et al.*, 1989), **BSR2**, **BSR3**, y **BSR4** ("bypass Sec14p recesivo") en los que había mutaciones recesivas y **BSD1** y **BSD2** con mutaciones dominantes (Cleves *et al.*, 1991). Se comprobó que la supresión del efecto de la mutación *sec14^{ts}* se debía, en todos los casos, a la circunvalación de la función de esta proteína. Dicha supresión no era debida a alteraciones de otros productos génicos que pudieran regular su actividad o a la sobreexpresión de Sec14p^{ts}. También se describió que la supresión era eficiente y circunvalaba específicamente la función de *SEC14*, ya que los estadios finales de la ruta de secreción seguían siendo necesarios para la viabilidad de los mutantes (Cleves *et al.*, 1991).

SAC1 es un gen que había sido identificado por la capacidad de diferentes alelos mutantes de suprimir mutaciones que producen defectos en el citoesqueleto de actina (*act1-1^{ts}*) de la levadura (Novick *et al.*, 1989) y que, además, puede suprimir los defectos de varios mutantes en la ruta de secreción como son *sec14*, *sec6* y *sec9* (éstos dos últimos son mutantes de estadios de la ruta posteriores al aparato de Golgi) (Cleves *et al.*, 1989).

El hallazgo de que en el mutante *bsr4* el gen que se encuentra mutado es *CK11*, que codifica la enzima colina quinasa (CK1asa, enzima que cataliza el primer paso de la síntesis de fosfatidilcolina (PC) vía CDP-colina) (figura 5), llevó a plantearse si la supresión se trataba de un efecto general de la inactivación de esta ruta. Con la interrupción de *CPT1*, que codifica la enzima colinafosfato fosfotransferasa (tercera enzima de esta misma ruta) (figura 5), se comprobó que la carencia de dicho gen también suprime los efectos producidos por la disfunción de *SEC14* (Cleves *et al.*, 1991). De esta forma, se describió la séptima mutación supresora del fenotipo de *sec14^{ts}* (*cpt1*) y se propusieron, por primera vez, vínculos de unión entre la secreción de proteínas, el transporte intracelular de fosfolípidos y la biosíntesis de fosfolípidos vía CDP-colina.

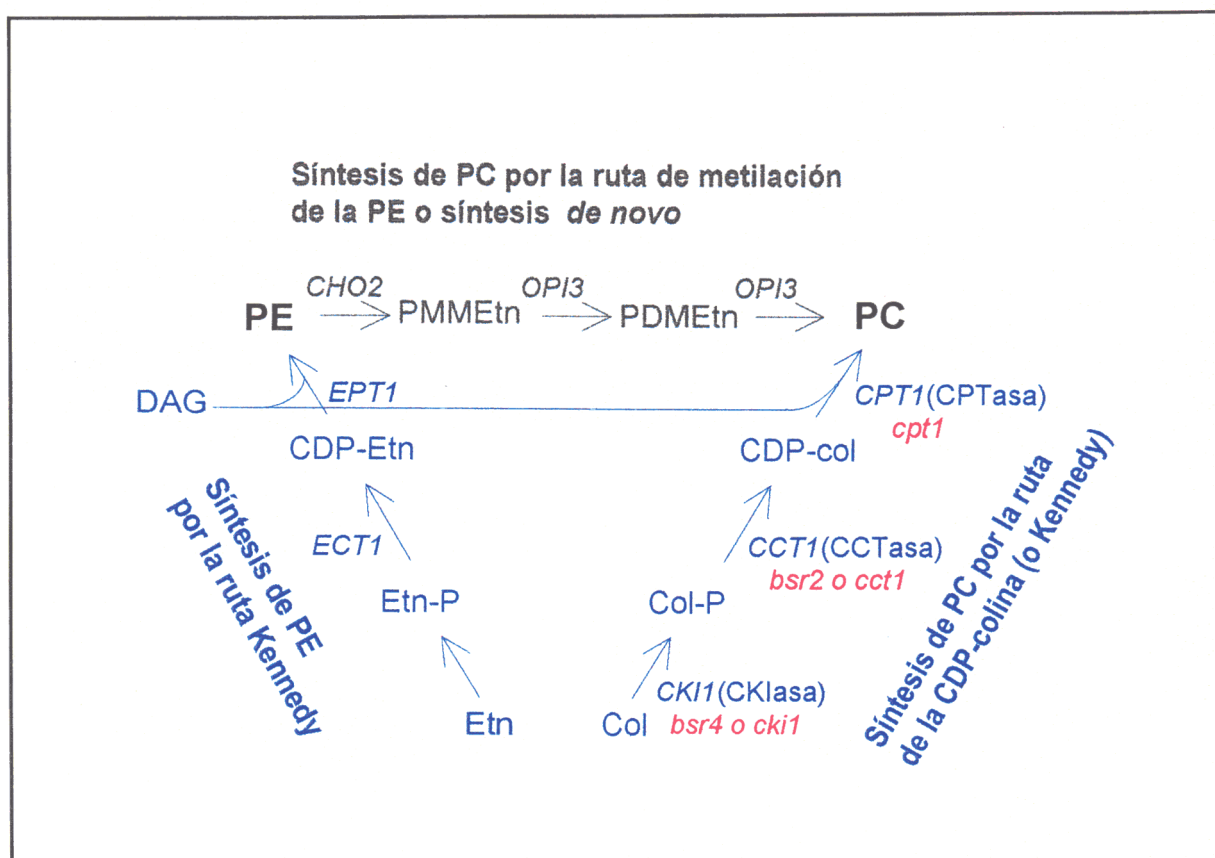


Figura 5. Rutas de síntesis de fosfatidilcolina (PC) en *S. cerevisiae*: síntesis *de novo* (verde) y ruta de la CDP-colina o Kennedy (azul). También se describe la ruta de síntesis de fosfatidiletanolamina (PE) por la ruta Kennedy. En cursiva y en mayúsculas aparecen los nombres de los genes que codifican las enzimas implicadas en estas rutas, en rojo los nombres de los mutantes en que se suprime el fenotipo *sec14^{ls}* y entre paréntesis las abreviaturas de las actividades enzimáticas de las proteínas codificadas por dichos genes: CKIasa, colina quinasa; CCTasa, colinafosfato citidililtransferasa; CPTasa, colinafosfato fosfotransferasa. Etn: etanolamina, Etn-P: etanolaminafosfato, CDP-Etn: CDP-etanolamina, DAG: diacilglicerol, PMMEtn: fosfatidilmonometiletanolamina, PDMEtn: fosfatidildimetiletanolamina, Col: colina, Col-P: colinafosfato, CDP-Col: CDP-colina. Las enzimas que codifican los genes de las rutas distintas a la de la CDP-colina son: *ECT1*: etanolaminafosfato citidililtransferasa, *EPT1*: etanolamina fosfotransferasa, *CHO2*: fosfatidiletanolamina *N*-metiltransferasa y *OPI3*: fosfolípidos *N*-metiltransferasa.

Los datos expuestos permiten distinguir claramente entre dos clases generales de mutantes que circunvalan la función de Sec14p:

A) Aquellos deficientes en funciones de la síntesis de PC vía CDP-colina:

- cpt1* (colinafosfato fosfotransferasa),
- bsr2* o *cct1* (*BSR2* se ha identificado como el gen estructural de la enzima colinafosfato citidililtransferasa, CCTasa (ver figura 5) (McGee *et al.*, 1994)),
- y *bsr4* o *cki1* (colina quinasa1).

B) Aquellos que no son deficientes en la ruta de PC vía CDP-colina:

- bsr3* o *kes1*, *bsd1*, *bsd2* y *sac1*.

El estudio genético y bioquímico de todos estos mutantes ha aportando muchos datos sobre la función de *SEC14* en la ruta de secreción de proteínas. Todos estos datos, excepto los conocidos sobre el mutante *bsd2*, se han integrado en un modelo de actuación de Sec14p *in vivo* que se comenta en el punto siguiente.

El gen estructural que se encuentra alterado en el mutante *bsd2* no ha sido descrito hasta la fecha, pero estudios del mutante han revelado que, al igual que *sac1*, es un mutante auxótrofo para el inositol. Esta auxotrofia se debe al fallo en la regulación del gen *INO1*, necesario para la biosíntesis del inositol. La expresión de *INO1* está normalmente regulada por el complejo Ino2p/Ino4p. Este complejo es necesario para la *trans*-activación del gen estructural *INO1* y, a su vez, se encuentra regulado por Opi1p (proteína que actúa como regulador negativo, reprimiendo la expresión de *INO2* en presencia de inositol) (Ashburner y Lopes, 1995). En el mutante *bsd2*, la inactivación específica del regulador positivo Ino2p produce una represión constitutiva de la expresión del gen *INO1*, que trae como resultado final la auxotrofia para el inositol anteriormente citada (Kagiwada *et al.*, 1996). En este mutante, también se ha detectado que el PI recién sintetizado es digerido con mayor velocidad que en estirpes parentales. Se ha propuesto que la proteína codificada por el gen mutado en *bsd2* podría tener actividad fosfolipasa que digeriría el PI. Esta digestión se encontraría acelerada en los mutantes *bsd2*. Uno o varios productos resultantes de dicha digestión (pueden ser inositol y diacilglicerol (DAG) o ácido fosfatídico (PA)) podrían modular de manera coordinada, pero independiente, los dos procesos afectados en *bsd2*: la vía de Sec14p/Golgi y la biosíntesis de inositol (ver figura 6) (Kagiwada *et al.*, 1996).

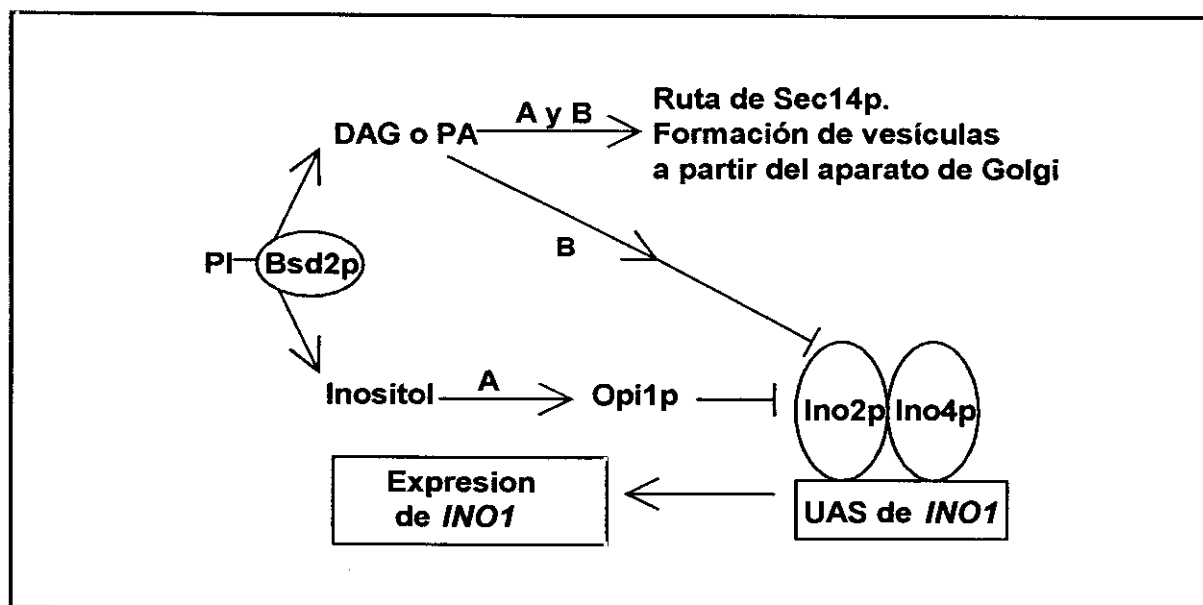


Figura 6. Modelos de actuación de Bsd2p. PI: fosfatidilinositol; DAG: diacilglicerol; PA: ácido fosfatídico. En ambos modelos Bsd2p tendría actividad fosfolipasa y liberaría dos productos (uno podría ser inositol y el otro DAG o PA). Según el modelo A, cada uno de los productos liberados actuarían de forma independiente en la regulación de la ruta de Sec14p y en la síntesis de inositol. Según el modelo B, sólo uno de los productos liberados por Bsd2p (podría ser DAG o PA) influiría en la regulación de ambos procesos. También habría que considerar una tercera alternativa, según la cual el mutante *bsd2* tendría una actividad transcripcional alterada en una, o varias, redes regulatorias que finalmente afectaría a la función de Golgi y a la expresión de *INO2* (Kagiwada *et al.*, 1996).

3.1.2.3. Modelo de actuación de Sec14p *in vivo*.

Los datos obtenidos a partir del establecimiento de la relación entre Sec14p y la síntesis de PC por la ruta de la CDP-colina indicaban que esta proteína puede tener un papel *in vivo* importante y relacionado con la síntesis de fosfolípidos en las membranas del aparato de Golgi.

El estudio de la composición fosfolipídica cuantitativa de las membranas del aparato de Golgi, tanto en levaduras silvestres como en otras en las que el proceso de secreción de proteínas no necesita de la función de Sec14p (mutantes con mutaciones supresoras), ha aportado datos concluyentes sobre la relación de esta proteína con la síntesis de PC. Se comprobó que Sec14p actúa manteniendo un contenido reducido de PC en las membranas del aparato de Golgi y que su sobreproducción reduce de forma importante la biosíntesis de PC a través de la ruta de la CDP-colina (McGee *et al.*, 1994). Sin embargo, en la biosíntesis de PC mediante la ruta de metilación de PE o síntesis *de novo* (ver figura 5), no se produce ninguna variación en respuesta a cambios en la expresión de Sec14p. Mediante la regulación de la ruta de la CDP-colina, se mantiene en las membranas de Golgi una relación PI/PC elevada que se había propuesto como crítica para mantener su capacidad secretora (McGee *et al.*, 1994).

Sec14p reprime la biosíntesis de PC mediante la inhibición de la enzima limitante de la ruta de la CDP-colina (Skinner *et al.*, 1995). Esta enzima, colinafosfato citidililtransferasa (CCTasa), es inhibida por Sec14p solamente cuando la concentración de PC en las membranas de Golgi es elevada, ya que en estas circunstancias Sec14p se encontraría unido a PC y es en esta forma cuando reprime la síntesis de nueva PC. Si, por el contrario, el balance PI/PC en las membranas del aparato Golgi es elevado, Sec14p estaría unido a PI y en esta forma no reprimiría la CCTasa, sino que se permitiría la síntesis de PC para equilibrar su concentración (ver figura 7) (Skinner *et al.*, 1995). Según este modelo, denominado "modelo del sensor", Sec14p actuaría como un sensor que controlaría la composición de fosfolípidos de las membranas del aparato de Golgi manteniéndola adecuada para la formación de las vesículas de la ruta de secreción.

Datos muy recientes indican que lo que es realmente crítico para que se produzca la formación de vesículas de secreción a partir del aparato de Golgi es la cantidad de diacilglicerol (DAG) existente sus membranas. Mediante el estudio del mutante *sac1*, se comprobó que la supresión del fenotipo termosensible de *sec14^{ts}* se debe a una alteración del metabolismo de fosfolípidos que produce un incremento en la cantidad de DAG existente en las membranas del aparato de Golgi (Kearns *et al.*, 1997). Sac1p es una proteína integral de membrana del complejo de Golgi y del RE cuya secuencia está relacionada con inositol-5-fosfatasa. Mutantes en *SAC1* presentan defectos en la función secretora a nivel de Golgi, en la organización del citoesqueleto de actina y son auxótrofos para el inositol (Cleves *et al.*, 1989; Whitters *et al.*, 1993). Se ha comprobado que la supresión de los defectos de *sec14* en mutantes *sac1* se debe a un metabolismo de esingolípidos acelerado. Durante dicho metabolismo se producen dos moles de DAG, lo que implica que en estos mutantes se produce una mayor cantidad de este compuesto que permite la formación de de las vesículas de secreción. Además, en mutantes *sac1* el recambio de PI del aparato de Golgi también se encuentra acelerado. Por todo ello, se ha descrito que Sac1p está implicada en la regulación del metabolismo de fosfolípidos (Kearns *et al.*, 1997). También se ha descrito que la otra función conocida de Sac1p (transporte de ATP al interior del RE) no está relacionada con Sec14, sino que es totalmente independiente.

Para ratificar el papel crítico del DAG en la formación de las vesículas a partir del aparato de Golgi Kearns y col. (Kearns *et al.*, 1997) comprobaron que:

- ① El diacilglicerol (con ácidos grasos de cadena corta) aumenta la producción de invertasa en mutantes *sec14^{ts}* y se aumenta la eficiencia con que el alelo *sac1-22* suprime el defecto de secreción de los mismos mutantes.
- ② La expresión en una cepa *sec14^{ts}* de una DAG-quinasa de *E. coli* (que produce disminución de DAG y aumento de PA) provoca una disminución de la temperatura a la cual pueden vivir estas cepas (Kearns *et al.*, 1997). Esto indica una capacidad secretora menor que en los propios mutantes *sec14^{ts}*.

Todos estos datos apoyan la idea de que la existencia de una determinada cantidad de DAG en las membranas del aparato de Golgi es fundamental para que éstas sean competentes en el proceso de formación de vesículas de secreción.

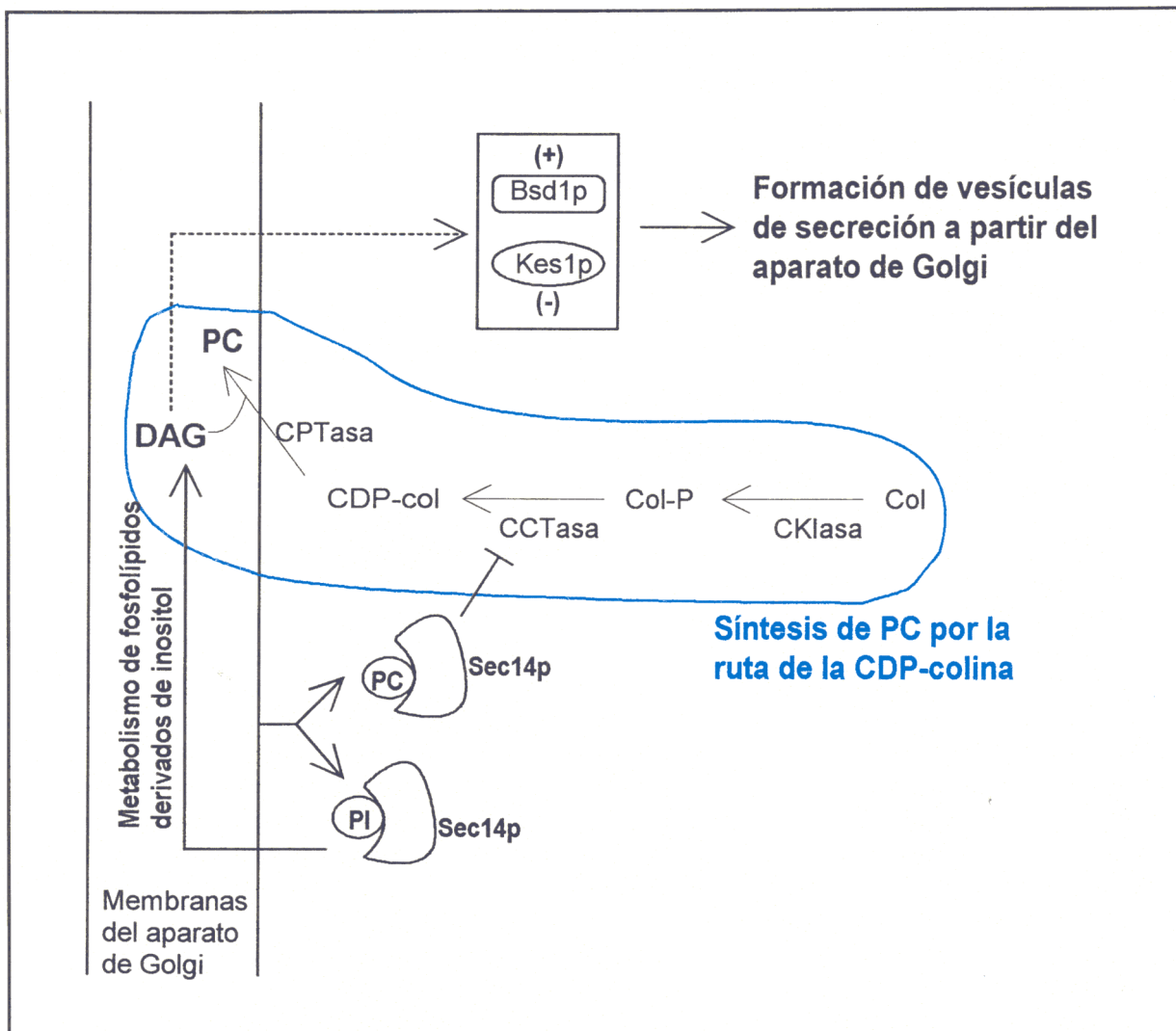


Figura 7. Modelo del mecanismo de actuación de Sec14p. Para detalles, ver el texto. Adaptada de Kearns y col., 1997.

Según los últimos datos expuestos, la inhibición de la síntesis de PC por la vía de la CDP-colina por parte de Sec14p tendría como objetivo final evitar que se consuma DAG en dicha síntesis, cuando no sea necesario. En este modelo, además, la forma de Sec14p unida a PI colaboraría en el mantenimiento de la cantidad de DAG adecuada, mediante la regulación del metabolismo de fosfolípidos derivados del inositol (Kearns *et al.*, 1997).

Datos sobre los genes alterados en los otros mutantes en los que se suprime el fenotipo termosensible *sec14^{ts}* han implicado más proteínas en el modelo de actuación de Sec14p:

El gen **KES1** es el que se encuentra alterado en los mutantes **bsr3**. Este gen codifica la proteína Kes1p, homóloga a la proteína humana de unión a oxisterol (OSBP) y que se localiza principalmente en el citosol de la levadura. La sobreexpresión de la proteína Kes1p elimina la supresión del fenotipo termosensible de *sec14^{ts}* que se produce en los mutantes *cpt1*, *cct1*, *cki* (con mutaciones en la síntesis de PC por la ruta de la CDP-colina) y en *bsd1*; es decir, en estos mutantes en los que se ha suprimido el bloqueo del crecimiento a 37°C producido por la mutación *sec14^{ts}*, si se introduce el gen **KES1** en un plásmido multicopia, se revierte nuevamente al fenotipo termosensible. Esto indica que esta proteína actuará como efector negativo sobre el efecto final producido por Sec14p posteriormente a la síntesis de PC por la vía CDP-colina (Fang *et al.*, 1996). De esto se deduce que el bloqueo de Kes1p permitirá la formación de las vesículas de secreción (ver figura 7). Se ha comprobado que la interrupción del gen **KES1** no produce disminución de la síntesis de PC por la vía de la CDP-colina, lo que ratifica que la actuación de este gen es posterior a dicha vía metabólica (Fang *et al.*, 1996). De acuerdo con la idea de que kes1p es un efector negativo, es posible que el DAG de las membranas del aparato de Golgi regule negativamente a Kes1p, permitiendo así la formación de las vesículas de secreción.

En el mutante **bsd1** no se conoce todavía qué gen se encuentra alterado. Si se sabe que su actuación será, como en el caso anterior, posterior a la síntesis de PC por la ruta de CDP-colina, ya que ésta ruta no se encuentra alterada en los mutantes *bsd1*. Además, el hecho de que la sobreexpresión de Kes1p elimine los fenotipos relacionados con *bsd1* indica una interacción antagónica entre estas dos proteínas, por lo cual la proteína codificada por el gen **BSD1** es considerada como un regulador positivo de la ruta de Sec14p posterior a la ruta de la CDP-colina (Fang *et al.*, 1996; Kearns *et al.*, 1997)(ver figura 7).

3.1.2.4. Distintas funciones celulares en las que se ha implicado a Sec14p.

La implicación de Sec14p en la ruta de secreción de proteínas al nivel del aparato de Golgi es conocida desde el aislamiento del mutante *sec14^{ts}*, pero la evidencia directa de que su papel consistiera específicamente en colaborar en la formación de vesículas de secreción (como se comenta en el párrafo anterior) se ha descrito muy recientemente. Se comprobó que Sec14p era capaz de estimular la formación de vesículas de secreción a partir de la red del *trans*-Golgi en un ensayo libre de células derivado de una línea celular neuroendocrina (Ohashi *et al.*, 1995). De esta forma, además de describir el papel que Sec14p puede tener *in vivo* en la levadura, también se ratifica el concepto de la conservación de la maquinaria secretora desde levaduras hasta mamíferos, ya que, a pesar de no compartir identidad en la secuencia con las proteínas de transferencia de

fosfatidilinositol de mamíferos (PITPs), Sec14p puede sustituirlas y presentarse activa en este ensayo en una línea celular de mamífero.

También se ha descrito la capacidad de Sec14p de intervenir, sustituyendo a las PITPs de mamíferos, en el proceso de secreción regulada que puede ocurrir en estas células y, más concretamente, en el paso de cebado dependiente de ATP que tiene que producirse para que los gránulos de secreción puedan fusionarse con la membrana plasmática (Hay y Martin, 1993) (punto 2.5 y 3.2.3.1 de la introducción). Teniendo en cuenta que en levaduras no se ha descrito secreción regulada, estos datos indican que dicho proceso de cebado comparte con la secreción constitutiva el mecanismo que implica a Sec14p o a las PITPs de mamíferos.

Recientemente, y por último, también se ha comprobado que Sec14p puede sustituir a las PITPs de mamíferos en los sistemas de transducción de señales de células de mamífero mediados por lípidos derivados de inositol y por la fosfolipasa C, en los que estas proteínas intervienen (punto 3.2.3.3. de la introducción) (Cunningham *et al.*, 1996).

3.1.3. Genes homólogos a SEC14 en otras levaduras.

La proteína Sec14p presenta un elevado grado de conservación en distintas especies de levaduras y hongos. Por medio de inmunoprecipitación con anticuerpos frente a Sec14p de *S. cerevisiae*, se detectó esta proteína tanto en *Kluyveromyces lactis* como en *Schizosaccharomyces pombe* (Bankaitis *et al.*, 1989). La clonación del gen *SEC14* de *K. lactis* permitió comprobar que la secuencia proteica presenta un 77 % de identidad con Sec14p de *S. cerevisiae* y que ambas proteínas presentan homología funcional. La proteína Sec14p de *K. lactis* presenta un peso molecular aparente de 34 kDa y es un poco más ácida (pI=4,9) que su homóloga de *S. cerevisiae* (pI=5,3). El gen *SEC14* de *K. lactis*, a diferencia del mismo gen de *S. cerevisiae*, no presenta ningún intrón (Salama *et al.*, 1990).

La clonación y caracterización funcional del homólogo a *SEC14* de la levadura dimórfica *Yarrowia lipolytica* aportó datos novedosos sobre la función de esta proteína. Este gen fue clonado tanto a partir de una genoteca genómica como de una de cDNA. De esta manera, se comprobó que presenta dos intrones en la zona 5' del RNA mensajero. *SEC14* de *Y. lipolytica* codifica una proteína de 497 residuos (58 kDa de peso molecular aparente), de los cuales los 300 aminoácidos aminoterminales comparten un elevado grado de homología con el resto de las proteínas Sec14p (65 % y 65,8 % con las de *S. cerevisiae* y *S. pombe*, respectivamente), mientras que los 197 residuos restantes no tienen proteínas homólogas descritas en ningún organismo. Esta parte presenta una región rica en prolina, seguida de una zona de elevada cantidad de leucinas (Lopez *et al.*, 1994). En contraste con su homólogo de *S. cerevisiae*, *SEC14* de *Y. lipolytica* no es un gen esencial para el crecimiento de la levadura (a pesar de representar la única actividad PITP detectable en este microorganismo), así como tampoco es necesario para la secreción de proteínas (ya que un mutante de delección de este gen presenta inalterada la función de secreción de proteínas). Este gen, sin embargo, parece ser necesario para el proceso de diferenciación morfológica de levadura a micelio que lleva a cabo *Y. lipolytica* (un mutante con *SEC14* interrumpido no es capaz de llevar a cabo este proceso de transición dimórfica) (Lopez *et al.*, 1994).

Estos datos indican claramente que esta proteína tiene funciones diferentes en las distintas levaduras y muestran el peligro de especular sobre la universalidad de su acción *in vivo* antes de obtener evidencias experimentales (Alb *et al.*, 1996). El estudio de las modificaciones ultraestructurales de los mutantes *sec14*, tanto en *S. cerevisiae* como en *Y. lipolytica*, ha permitido detectar diferencias importantes. En el mutante de *S. cerevisiae* van apareciendo a lo largo del tiempo distintas formas aberrantes, desde túbulos delgados y anastomosados cercanos al RE hasta gránulos dispersos por el citoplasma o cuerpos esféricos idénticos a vacuolas. Sin embargo, en el mutante de *Y. lipolytica* sólo se observan profundas invaginaciones en la membrana citoplasmática. De esto se concluye que la diferencia en el papel de Sec14p en ambos organismos podría estar relacionada con que dicha proteína cumpla su papel regulatorio en distintas estructuras celulares, es decir, el aparato de Golgi en *S. cerevisiae* y la membrana plasmática en *Y. lipolytica* (Rambourg *et al.*, 1996). Esta última afirmación puede ser algo contradictoria con la supuesta colocalización en cierta medida de Sec14p de *Y. lipolytica* con XPR6p (presunto marcador de Golgi) (Lopez *et al.*, 1994).

Nuevas secuencias de genes *SEC14* de otras levaduras están depositadas en las bases de datos: *SEC14* de *S. pombe* y *C. glabrata*. La caracterización de las proteínas codificadas por estos genes, así como de sus funciones en los correspondientes microorganismos pueden aportar nuevos datos de gran interés en esta cuestión.

En *S. cerevisiae* se ha localizado, mediante secuenciación de la zona adyacente al gen *BUD2* (cromosoma XI), el ORF (*YKL091c*) que codifica YKJ1p. Esta proteína comparte un elevado grado de homología con Sec14p (62,5 % según el programa BLITZ) pero su función es desconocida hasta el momento ((Cvrcková y Nasmyth, 1993); EMBL database).

3.2. Proteínas de transferencia de fosfatidilinositol en mamíferos.

3.2.1. Actividad, distribución y conservación.

Desde hace años se han caracterizado y purificado proteínas de tejidos de mamíferos y plantas que facilitan el transporte de fosfolípidos entre distintas membranas *in vitro*. Algunas de estas proteínas se caracterizan por ser capaces de transferir PI y PC, presentando marcada preferencia por el PI (De Vries *et al.*, 1995; Helmkamp, *et al.*, 1974; Van Paridon *et al.*, 1987; Wirtz, 1991). Tanto mediante hibridaciones con anticuerpos frente a PITP de cerebro bovino, como con hibridaciones DNA-DNA, se ha podido observar la amplia distribución y conservación a través de la escala filogenética de estas proteínas y de los genes correspondientes. De esta manera, se ha comprobado su existencia además de en mamíferos también en pájaros, reptiles, anfibios e insectos (Dickenson *et al.*, 1994; Helmkamp, 1990).

Tabla III. Características de distintas proteínas de transferencia de fosfatidilinositol y fosfatidilcolina de mamíferos.

Proteína	Origen	Tamaño y punto isoelectrico	Aislamiento (clonación o purificación)		Expresión	Referencias
PITP α	rata	271aa, 31,9 kDa (pt)*	Hibridación con anticuerpos frente a PITP de cerebro bovino	con	2 mRNAs. Más cantidad de 1,9 kb que de 3,4 kb. En todos los tejidos examinados: mayor cantidad en testículos que en cerebro, ventrículo izquierdo y riñón	{dickenson1989}
PITP β	rata	271 aa, 31,4 kDa (pt)* 36 kDa (pa)*	Complementación de <i>sec14^{ts}</i> con genoteca de expresión de cerebro		1mRNA de 3 kb En cerebro, pulmón, hígado, riñón y algo en testículos (muy poco).	{tanaka1994}
PITP α	bovina	35 kDa (pa)* pI=5,5 unida a PI pI=5,7 unida a PC	purificación de cerebro			{devries1995; helmkamp1974; thomas1993; vanparidon1987a}
PITP β	bovina	36 kDa (pa)* pI=5,4 unida a PI (también une SM)	purificación de cerebro			{devries1995; helmkamp1974}
PITP α (codificada por <i>PPI1</i>)	hombre	270 aa 31,8 kDa (pt)*	hibridación de genoteca en λ gt11 (cDNA) de testículos con cDNA de PITP α de rata		2 mRNAs. Más cantidad de 4,1kb que de 1,6kb. En 8 tejidos examinados. Mayor en páncreas y menor en corazón.	{dickenson1994; tanaka1995}
PITP β (codificada por <i>PPI2</i>)	hombre	271aa 31,5 kDa (pt)*	hibridación de genoteca de cDNA de cerebro con PITP β de rata.		1 mRNA de 3,4kb. En los 8 tejidos analizados. Mayor en hígado y menor en músculo esquelético.	{tanaka1995}

(pt)* 'indica el peso molecular teórico y (pa)* el peso molecular aparente.

A partir de estudios, tanto bioquímicos como genéticos, en estos últimos años se han identificado dos isoformas de PITP, α y β , ampliamente distribuidas en los distintos tejidos de diferentes mamíferos (bóvidos, rata, hombre). Se trata de uno de los tipos de proteínas más conservadas de las conocidas hasta la fecha. Así:

- las isoformas α de la PITP humana y su homóloga de rata comparten un 98,9 % de identidad (Dickenson *et al.*, 1994),
- las PITP β s de las mismas especies comparten un 98,1 % de identidad (Tanaka *et al.*, 1995),
- y entre las distintas isoformas de la misma especie también se observa un elevadísimo grado de homología (77 % de identidad entre PITP α y β de rata (Tanaka y Hosaka, 1994)).

Ambas isoformas de las PITPs de mamíferos se han implicado en las mismas funciones celulares y tienen características muy similares, por lo que en ocasiones se copurifican o son difíciles de separar. Las diferencias más importantes entre ambas isoformas, descritas hasta el momento, se refieren a su capacidad de transferir esfingomielina (SM) y a su localización intracelular. Así, mientras la PITP α no transfiere esfingomielina *in vitro*, las isoformas β purificadas, tanto de cerebro bovino como de hígado de pollo, son muy eficientes en la transferencia de este lípido (De Vries *et al.*, 1995; Westerman *et al.*, 1995). Respecto a la localización, Snoek y col. (Snoek *et al.*, 1992; Snoek *et al.*, 1993) detectan PITP asociada al aparato de Golgi en fibroblastos de ratón suizo 3T3 cuando estos son estimulados por agentes que activan la proteína quinasa C (PKC), pero estos autores no distinguen entre ambas isoformas. Sin embargo, de Vries y col. (De Vries *et al.*, 1995) comprueban en esta misma línea celular que, mientras PITP α se distribuye predominantemente en el citoplasma y asociada al núcleo, PITP β está preferentemente asociada al complejo de Golgi. Aunque ninguna de las dos isoformas comparte homología con la secuencia de Sec14p, la localización de PITP β es más parecida a la de la proteína de levadura. Por esto, de Vries y col. (De Vries *et al.*, 1995) proponen que la isoforma PITP β sería la que realizaría las mismas funciones que Sec14p *in vivo*, mientras que la isoforma PITP α estaría implicada en otro tipo de funciones celulares.

3.2.2. Caracterización de las PITPs de diferentes especies de mamíferos.

Debido a que las PITPs se han estudiado desde hace muchos años, los datos conocidos sobre ellas hasta 1991 se encuentran recopilados en la revisión de Wirtz (Wirtz, 1991). Las características más relevantes para nuestro trabajo de algunas PITPs purificadas o clonadas de mamíferos se exponen a continuación y en la tabla III.

3.2.2.1. Proteínas de transferencia de fosfatidilinositol de rata.

La isoforma PITP α de rata ha sido la proteína de este grupo más caracterizada a nivel molecular. Se ha descrito que sustituciones en los residuos Ser²⁵, Thr⁵⁹, Pro⁷⁸ y Glu²⁴⁸ producen una importantísima reducción de la capacidad de transferencia de PI sin afectar a la transferencia de PC. Este dato nos indica la posibilidad de desacoplamiento del transporte de PI y PC en estas proteínas. También se observa que el residuo Thr-59

se encuentra conservado dentro de un dominio de fosforilación de PKC (a su vez también conservado). Esto sugiere una posibilidad de regulación de esta proteína *in vivo* y se ha propuesto un modelo en el cual el transporte vectorial de PI por PITP *in vivo* de una membrana donadora a una membrana aceptora estaría regulado por un ciclo en el que intervendría PKC fosforilando a la PITP y una proteínofosfatasa liberando el fosfato (Alb *et al.*, 1995). Según este modelo, la PITP se cargaría con PC o PI en la membrana donadora (de donde partiría sin fosforilar); al llegar a la membrana aceptora se liberaría de su carga y allí se fosforilaría mediante PKC. Esta forma fosforilada no podría cargarse con PI y regresaría a la membrana anterior sin carga o con PC y, por último, en la membrana donadora la fosfatasa hidrolizaría el fosfato de la PITP y ésta podría volver a cargarse con PI o PC. También se ha comprobado, mediante proteólisis controlada, que la eliminación del extremo carboxiterminal de esta proteína, desde los aminoácidos Arg²⁵³ y Arg²⁵⁹, aumenta su afinidad por vesículas lipídicas, a la vez que disminuye su actividad de transferencia de lípidos (Tremblay *et al.*, 1996).

Cabe destacar que la clonación de la isoforma β de la PITP de rata se realizó mediante complementación funcional de un mutante de *S. cerevisiae* *sec14^{ts}* (Tanaka y Hosaka, 1994). Esto indica que, a pesar de la falta de homología entre Sec14p y PITP β , esta última puede aliviar el defecto de crecimiento del mutante *sec14^{ts}*. Asimismo, la isoforma α , que tampoco comparte homología con la secuencia de Sec14p, es capaz de complementar los defectos de dicho mutante (ver introducción, punto 3.1.2.1. (Skinner *et al.*, 1993)).

3.2.2.2. Proteínas humanas de transferencia de fosfatidilinositol.

Los genes de ambas isoformas de las PITPs humanas se clonaron por hibridación con genotecas de cDNA (Dickenson *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1995) y, como ya se ha mencionado anteriormente, las proteínas que codifican comparten un 98,9 % y 98,1 % de identidad con las homólogas de rata. Además, la comparación del cDNA del gen que codifica la PITP α humana con su homólogo de rata revela una secuencia muy similar incluso en las zonas flanqueantes no traducidas (88 % y 84 % en 5' y 3', respectivamente).

La expresión de ambas isoformas de proteínas de transferencia de lípidos es detectable en todos los tejidos examinados, pero la cantidad de mRNA varía en los distintos tejidos dependiendo de qué isoforma se trate (ver tabla III) (Tanaka *et al.*, 1995).

3.2.3. Funciones celulares en las que se ha implicado a las PITPs de mamíferos.

Las PITPs han sido implicadas en distintas e importantísimas funciones de la célula. Se ha comprobado la intervención de estas proteínas tanto en la secreción de proteínas (regulada y constitutiva) como en las rutas de transducción de señales a partir de un receptor de membrana (figura 8).

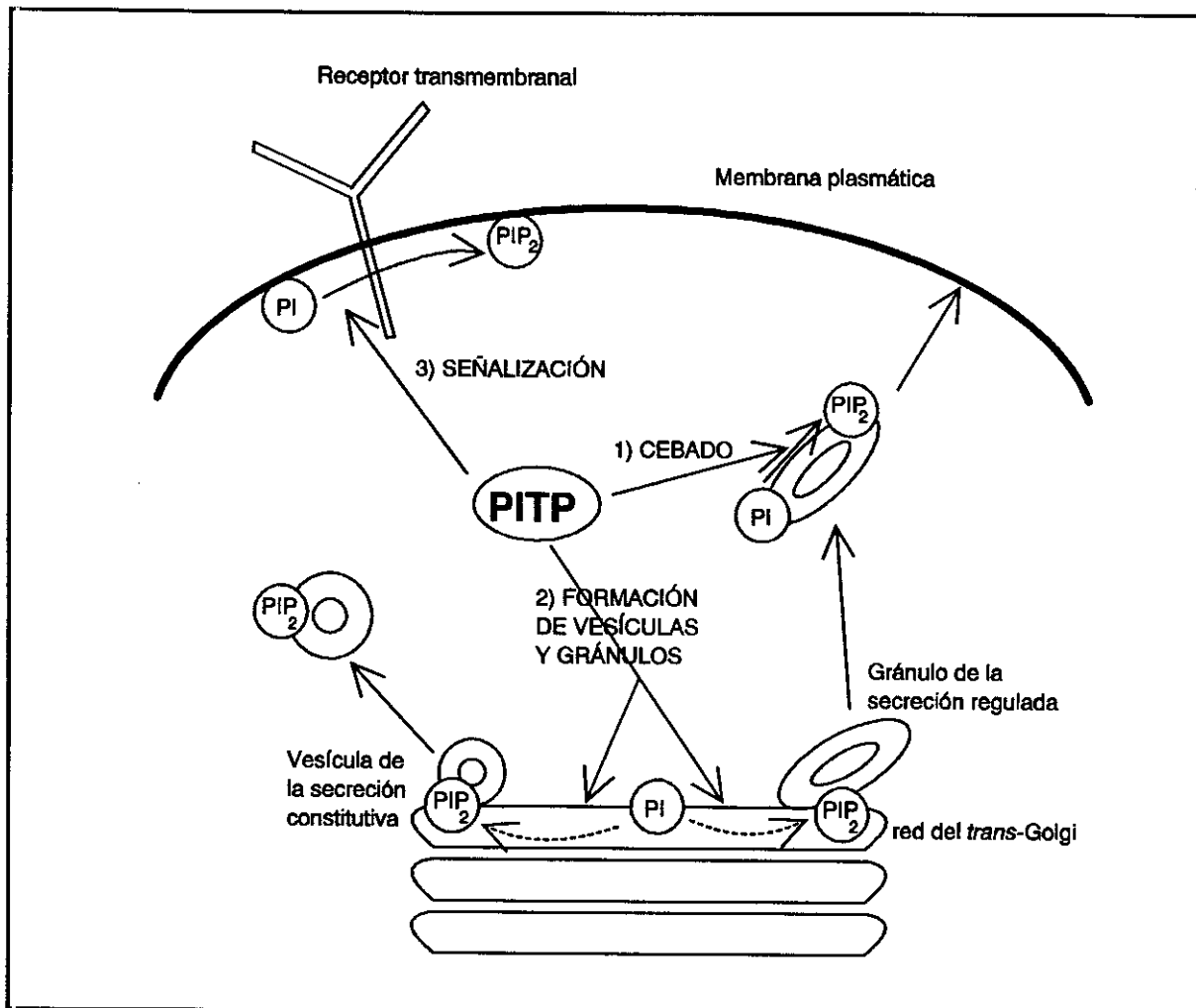


Figura 8. Funciones de las PIP₂ y PIP₃ en mamíferos. Adaptada de Alb y col., 1996. 1) Proceso de cebado de los gránulos que intervienen en la secreción regulada. 2) Formación de las vesículas que intervienen en el proceso de secreción constitutiva a partir de la red del *trans*-Golgi y formación de los gránulos que intervienen en la secreción regulada a partir de este mismo compartimento celular. 3) Procesos de transducción de señales en los que interviene cualquier isoforma de la PLC.

3.2.3.1. Implicación de las PIPs en proceso de cebado de los gránulos de la secreción regulada.

Uno de los factores de citosol de cerebro de rata purificado como necesario para el paso de **cebado de los gránulos de la secreción regulada**, llamado PEP3, resultó ser de la PIP₃ (aunque hay evidencias de varias isoformas de la proteína en el paso final de la purificación) (figura 8,1). Se ha descrito que Sec14p puede sustituir a esta PIP₃ en dicha función (Hay y Martin, 1993). Recientemente, se ha identificado otro de los factores citosólicos necesarios para el proceso de cebado, llamado PEP1, que actúa de forma sinérgica con la PIP₃, como una fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa (PIP5K). Este hecho indica que la PIP₃ y la PIP5K podrían actuar de forma secuencial en el reclutamiento de PI y la posterior fosforilación de sus derivados. Se postula un modelo en el cual la PIP₃ actuaría presentando el PI a una fosfatidilinositol-4-quinasa (PI4K) (ver figura 9A). Las

enzimas de este tipo están predominantemente asociadas a membranas (Carpenter y Cantley, 1990; Jenkins *et al.*, 1994) por lo que pueden estar presentes en las células permeabilizadas en las que se realiza el ensayo y es lógico que no se encuentre entre uno de los factores purificados de citosol. La PI4K convertiría el PI en PI-4-fosfato que sería el sustrato de la PIP5K, la cual lo transformaría posteriormente en PI-4,5-bisfosfato (PIP₂). La fosforilación del PI explicaría la necesidad de ATP en el proceso de cebado de los gránulos (Hay *et al.*, 1995). De esta forma, aparecería una zona en la membrana rica en PI-4,5-bisfosfato (PIP₂) (Alb *et al.*, 1996; Hay *et al.*, 1995) cuya posterior función no se conoce con seguridad. Por una parte, se ha postulado que regularía la actividad de CAPS145 (Alb *et al.*, 1996), que es una proteína de unión a Ca²⁺ que regula la fusión activada por Ca²⁺ de los gránulos de secreción (Walent *et al.*, 1992). Por otra parte, se ha propuesto que el dominio PIP₂ podría promover el ensamblaje del citoesqueleto de actina, ya que este último juega un papel importante en la dirección de los gránulos de secreción hasta la membrana plasmática (Hay *et al.*, 1995).

3.2.3.2. Implicación de las PITPs en la formación de vesículas de la secreción constitutiva y gránulos de la secreción regulada a partir del *trans*-Golgi.

Ambas isoformas de las PITPs de mamíferos han sido, asimismo, purificadas de cerebro bovino como necesarias para la **formación de vesículas y gránulos de secreción, constitutiva o regulada**, respectivamente, a partir de la red del *trans*-Golgi (TGN) (figura 8,2). Se ha comprobado que Sec14p puede sustituir a estas proteínas en este proceso. Otro factor citosólico todavía no identificado está implicado en la formación de vesículas a partir de la red del *trans*-Golgi y, por la necesidad de ATP y por analogía con el paso de cebado de gránulos de secreción, se postula que pueda ser una quinasa de lípidos derivados de inositol (Ohashi *et al.*, 1995). El modelo descrito propone que el aumento de los niveles de polifosfoinosítidos (lípidos fosforilados derivados de PI, que son los fosfolípidos más negativamente cargados) en lugares determinados de la membrana de la TGN, podría ser muy importante para el proceso de emergencia de vesículas, por implicar cambios importantes en la composición de la membrana que favorezcan su curvatura o por favorecer el reclutamiento de proteínas citosólicas necesarias para este proceso (Ohashi *et al.*, 1995).

Se ha descrito que la proteína Sec14p puede sustituir a las PITPs en cualquiera de sus funciones relacionadas con la secreción expuestas en estos dos puntos (introducción, 3.2.3.1. y 3.2.3.2.) (Hay y Martin, 1993; Ohashi *et al.*, 1995).

3.2.3.3. Implicación de las PITPs en las rutas de transducción de señales.

En mamíferos, la estimulación de receptores de superficie celular por hormonas, neurotransmisores o factores de crecimiento produce una respuesta celular mediada por cualquiera de las distintas isoformas de la enzima fosfolipasa C. Este proceso constituye una ruta de transducción de señales importantísima en este tipo de células. La activación de uno de los distintos tipos de receptores de superficie activa a una de las distintas isoformas de la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza rápidamente PIP₂. En esta hidrólisis se liberan dos segundos mensajeros: inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y DAG. El IP₃ moviliza Ca²⁺ intracelular y esto puede producir una serie efectos celulares (ej: contracción muscular). El diacilglicerol activa la enzima proteína quinasa C (PKC) que, una vez activada, fosforilará

proteínas intracelulares que finalmente regularán la expresión de una serie de genes produciendo el efecto final esperado (Berridge, 1993; Thomas *et al.*, 1993) (ver figura 9B). Algunos ejemplos de estos efectos finales serían la liberación de histamina por parte de las células cebadas en respuesta a un antígeno, o la contracción del músculo esquelético en respuesta a acetilcolina (Alberts *et al.*, 1994b; Nishizuka, 1992).

El PIP_2 que es hidrolizado por la PLC es sintetizado, previamente, mediante dos reacciones de fosforilación secuenciales a partir de PI. Este PI es transformado en PI-4-fosfato (PIP) mediante la PI-4-quinasa. Posteriormente, el PIP se fosforila en la posición 5 a través de la PI-4-fosfato-5-quinasa (PIP5K), transformándose así en PI-4,5-bifosfato que es el sustrato de la PLC (figura 9A).

Existen varias isoformas de PLC (PLC- β , PLC- γ y PLC- δ), además de diferentes subtipos de cada una de ellas (Cockcroft y Thomas, 1992; Rhee y Choi, 1992):

-La **PLC- β** está regulada por receptores transmembranales. La activación de dichos receptores, en respuesta a señales extracelulares, produce la estimulación de proteínas triméricas de unión a GTP que, a su vez, serán las que activarán a la PLC- β desencadenando finalmente la respuesta celular (ver figura 9B). Un ejemplo de este tipo de señalización es la agregación de las plaquetas inducida por la trombina.

-La **PLC- γ** esta regulada por otro tipo de receptores, también proteínas transmembranales, cuyos dominios citosólicos se fosforilan en tirosina al activarse por la unión del ligando al dominio extracelular de los mismos. Existen dos tipos de receptores que pueden activar a la PLC- γ : ① receptores tipo "tirosina quinasa" (ej: el receptor del factor de crecimiento epidérmico) y ② "receptores asociados a proteínas tirosina quinasa" (ej: receptor de IgE en células RBL-2H3). La PLC- γ se asocia a residuos de tirosina fosforilados de estos receptores activados y, de esta forma, se produce su activación que desencadenará efectos celulares específicos (Alberts *et al.*, 1994b).

La purificación de $\text{PITP}\alpha$ de cerebro bovino como un factor esencial para reconstituir la actividad de la **PLC β** mediada por GTP, en células HL60 permeabilizadas, implicó por primera vez a las PITPs en estas **rutas de transducción de señales** (Thomas *et al.*, 1993). La posterior observación de que $\text{PITP}\alpha$ controla la velocidad inicial de la reacción de la PI-4-quinasa en la síntesis de PIP_2 (ver figura 9A), llevó a postular que la función de esta proteína en señalización será reclutar o presentar PI a esta quinasa, lo que posteriormente proveerá a la PLC β de su sustrato (PIP_2). Lo que finalmente se propone es que la $\text{PITP}\alpha$ es, en realidad, un cofactor en este tipo de señalización, que posiblemente canaliza el PI directamente a la vía de las quinasas de lípidos. Se plantea la hipótesis de que la PLC β podría preferir como sustrato los lípidos que le llegan a partir de la $\text{PITP}\alpha$ a los residentes en membrana (Cunningham *et al.*, 1995). Esto podría concordar con la curiosa observación de que la célula tiene compartimentalizado el PIP_2 según sea "sensible a agonistas" (sería el utilizado en señalización) o "insensible" a éstos (Alb *et al.*, 1996; Monaco y Gershengorn, 1992).

La **PLC γ** es activada, entre otros, por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (receptor de EGF). Estudios de co-inmunoprecipitación han revelado que existe una asociación, dependiente de EGF, de la PITP tanto con el receptor de EGF, como con la PI-4-quinasa y con la PLC γ (Kauffmann-Zeh *et al.*, 1995). Esto implicaría a la PITP en la formación de un complejo con todas estas proteínas.

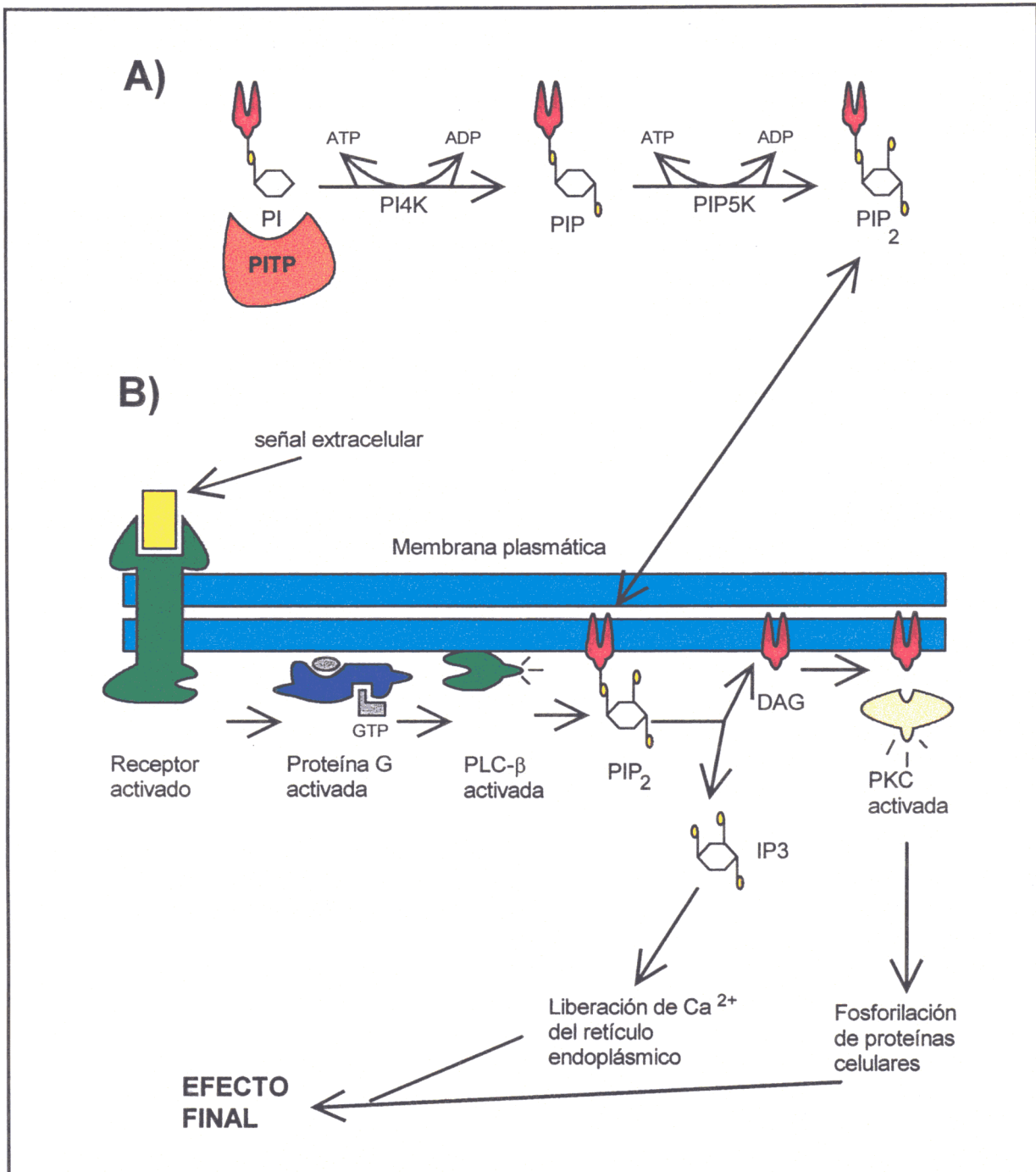


Figura 9. A) Síntesis de PIP_2 a partir del PI presentado por la PITP . Para detalles, ver texto. La intervención de la PITP en la síntesis de PIP_2 a partir de PI se ha propuesto como modelo de actuación de la PITP para explicar su implicación en secreción (tanto constitutiva como regulada) y en la transducción de señales. Cunningham y col. (Cunningham *et al.*, 1995) proponen, en el caso de la implicación de la PITP en la transducción de señales, que los derivados de PI sintetizados en esta ruta continuarían unidos a la PITP , la cual iría presentando los distintos sustratos a las siguientes quinasas y a la fosfolipasa C . **B) Modelo de actuación de la fosfolipasa $\text{C-}\beta$ en la transducción de señales captadas a través de un receptor transmembranral asociado a una proteína G .** La isoforma γ de la PLC se activa de forma diferente (sin intervención de las proteínas G triméricas) pero su actuación, una vez activada, sigue el mismo esquema.

Muy recientemente, se ha descrito que las dos isoformas, α (de carcinoma de hígado humano) y β (de cerebro de rata), de las PITPs y Sec14p son equivalentes en la reconstitución de la señalización. Esto ocurre tanto si la hidrólisis de PIP_2 es producida por la isoforma β de la PLC, como por la isoforma γ . En el caso de la isoforma γ , se ha comprobado para los dos tipos de receptores que pueden activarla. En resumen, la necesidad de PITPs es un requerimiento general en la señalización mediada por lípidos derivados de inositol cualquiera que sea la isoforma de PLC que interviene en ella. La falta de homología de secuencia, entre Sec14p y ambas isoformas de las PITPs de mamífero, ha llevado a sugerir que la capacidad común a estas tres proteínas de unir/intercambiar lípidos es la necesaria para su función en señalización (Alb *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1996). Como se apuntó anteriormente, su función podría ser aportar a las fosfolípidoquinasas los monómeros de PI que sean sus mejores sustratos (Alb *et al.*, 1996).

El hecho de que la PITP β tenga elevada capacidad de transferir esfingomielina (SM), unido al descubrimiento de que de un 10 % a un 20 % de la SM celular interviene en una nueva vía de transducción de señales (por la cual esta SM de la membrana plasmática se convierte en ceramida en respuesta a inductores extracelulares (Hannun, 1994; Linardic y Hannun, 1994)), plantea la cuestión de si la PITP β estaría implicada en esta otra vía de señalización (De Vries *et al.*, 1995).

De lo expuesto en todo este punto se podría concluir que las PITPs actuarían en diferentes funciones celulares de células de mamífero con un mecanismo que podría ser común. Este mecanismo consistiría en presentar PI a una ruta de PI quinasas de manera que se sintetizara el PIP_2 necesario en esas diferentes funciones fisiológicas. Todas las funciones en las que intervienen estas proteínas son de elevada importancia para el funcionamiento celular y, en todas ellas Sec14p puede sustituir a estas PITPs de mamífero (figura 8).

3.3. Modelo general del mecanismo de formación de vesículas a partir del aparato de Golgi: intervención de las PITPs y Sec14p.

Como se ha comentado a lo largo de toda la introducción, distintos estudios muy recientes (tanto de levaduras como células eucariotas superiores) han implicado cambios lipídicos de la composición de las membranas del aparato de Golgi en la formación de vesículas de secreción a partir de éste. Matin (Martin, 1997) ha propuesto un modelo en el cual se integran todos estos datos (figura 10). Según éste, la formación de vesículas es debida a variaciones en la composición fosfolipídica de dichas membranas que resultan en la formación de dicilglicerol (DAG) y ácido fosfatídico (PA):

-La generación de DAG necesita de PITPs (o Sec14p en levaduras). Estas proteínas, por una parte, inhibirán el consumo de DAG en la síntesis de PC y, por otra, promoverán su formación mediante el metabolismo de PI (Kearns *et al.*, 1997). La síntesis de DAG también está regulada por Sac1p, a través del control del metabolismo de esfingolípidos (Kearns *et al.*, 1997). El DAG puede alterar la curvatura de la membrana o/y reclutar proteínas de unión a DAG que es posible que intervengan en la formación de las vesículas. Las PITPs también presentarían al PI a kinasas que lo transformarían en PIP_2 (Ohashi *et al.*, 1995) (figura 10).

-La generación de PA se debe a otro proceso que se ha relacionado con la emergencia de vesículas en el aparato de Golgi (introducción, punto 2.3.3). El ARF activa la PLD, enzima que cataliza la formación de PA a partir de PC. El PA activa las enzimas que sintetizan PIP_2 y este compuesto, a su vez es necesario para la activación de la PLD (De Camilli *et al.*, 1996). De esta forma, se podrían generar en las membranas dominios con elevadas concentraciones de PA y PIP_2 (lípidos muy negativamente cargados). Dichos dominios podrían promover la curvatura de dichas membranas y en los que se podrían unir las proteínas de revestimiento (De Camilli *et al.*, 1996; Ktistakis *et al.*, 1996).

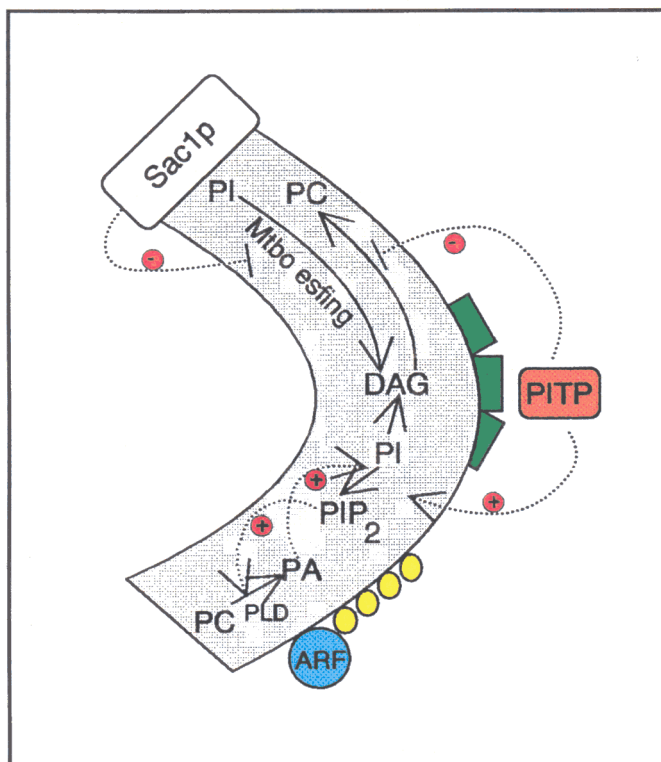


Figura 10. Modelo general de formación de vesículas de secreción en las membranas del aparato de Golgi. Adaptada de Martín, 1997. Se representa: en color gris, la membrana del aparato de Golgi; en verde, posibles proteínas de unión a diacilglicerol; y en amarillo, proteínas del revestimiento de las vesículas. Las flechas punteadas indican la regulación ejercida por distintas proteínas sobre algunas reacciones metabólicas. Mbo esfing.: metabolismo de esfingolípidos; PI: fosfatidilinositol; PC: fosfatidilcolina; DAG: diacilglicerol; PIP_2 : fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PA: ácido fosfatídico; PLD: fosfolipasa D.

3.4. Otras proteínas relacionadas con Sec14p o con las PITPs.

Se han descrito otras proteínas que comparten cierto grado de homología con Sec14p y que se mencionan a continuación:

- La proteína humana de unión a retinaldehído (HRBP) (Crabb *et al.*, 1988), con la que Sec14p comparte una homología de un 25 % en una región de 271 aa, fue la primera proteína homóloga descrita (Salama *et al.*, 1990). También ha sido caracterizada una proteína de unión a retinal de *Todarodes pacificus* ("Japanese flying squid") (Ozaki *et al.*, 1994). Estas proteínas unen ligandos hidrofóbicos.

- La proteína humana de transferencia de α -tocoferol (une y transfiere esta vitamina) también se ha descrito que presenta cierta homología (37,4 %) con Sec14p y la HRBP, sobre todo en las zonas amino y carboxiterminales (Arita *et al.*, 1995).

- *MEG2* es un gen humano que codifica una proteína con dos dominios diferenciados: un dominio catalítico carboxiterminal con actividad de proteína tirosina fosfatasa (PTPasa) y una región amino terminal con 254 aa homólogos a HRBP y Sec14p (24 % de identidad con esta última) (Gu *et al.*, 1992).

- Recientemente, también ha sido clonado un gen humano (*SEC14L*) que codifica una proteína parcialmente homóloga a Sec14p (6,9 % en toda la proteína, según el programa BLITZ y algo más en zonas determinadas), así como a la proteína de unión a retinal de *Todarodes pacificus* ("Japanese flying squid") y a dos hipotéticas proteínas de *Caenorhabditis elegans*. La proteína codificada por *SEC14L* tiene un tamaño bastante mayor a Sec14p (715 aa frente a 304 aa) y no se conocen datos respecto a su posible función o sus actividades enzimáticas (Chinen *et al.*, 1996).

- Además, en las bases de datos de secuencias han sido depositadas algunas proteínas más de *S. pombe* (Yas2p) o de *C. elegans* (Yn02p), cuya secuencia aminoacídica ha sido deducida directamente de genes de función desconocida y que, por presentar alguna homología con las proteínas anteriormente mencionadas, se les considera como pertenecientes a la familia del factor citosólico Sec14p.

Todas estas proteínas mencionadas son homólogas a Sec14p con distintos porcentajes de identidad, pero también existe otra clase de proteínas que tiene cierta homología con las PITPs de mamífero. Así, la proteína rdgB de *Drosophila melanogaster* (Vithelic *et al.*, 1991) de 116 kDa, y que es integral de membrana, presenta un dominio N-terminal parecido a la PITP de rata y con capacidad de transferencia de PI *in vitro* cuando se expresa como un péptido soluble (Vithelic *et al.*, 1993).

El estudio más detallado de todas estas proteínas podría proporcionar nuevos datos sobre las distintas funciones celulares de la familia de Sec14p, así como de la familia de las PITPs.

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de una de las líneas de investigación sobre *C. albicans*, existentes en nuestro grupo, es la identificación de distintas funciones de la célula fúngica que puedan ser utilizadas en el desarrollo de nuevos y selectivos fármacos antifúngicos. En concordancia con esta idea se plantearon los objetivos concretos del trabajo expuesto en la presente memoria:

1. Clonación del gen de *C. albicans* homólogo al gen *SEC14* de *S. cerevisiae* y análisis de las características tanto de dicho gen como de la proteína que codifica.
2. Construcción de mutantes de *C. albicans* con defectos en el gen clonado, cuyo estudio pudiera aportar datos sobre la importancia y el tipo de funciones en las que se encuentra implicado.
3. Estudio de las proteínas humanas que sean homólogas funcionales a la proteína codificada por el gen *SEC14* de levaduras, para obtener información sobre las posibilidades teóricas de encontrar fármacos antifúngicos con la selectividad adecuada, en el caso de que *SEC14* fuera utilizado como diana en el desarrollo de dichos fármacos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS.

Las cepas de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *C. albicans*, utilizadas en la realización de este trabajo y construidas durante la misma, se describen respectivamente en las tablas IV y V.

Tabla IV. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Fuente o Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α F'	K-12 $\Delta(lacZYA-argF)_{u169}$ <i>supE44 thi-1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA relA1</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15)F'	(Hanahan, 1988)
MC1061	<i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ $\Delta(lac)X74$ <i>galU galK strA</i>	R. L. Gourse
<i>S. cerevisiae</i>		
CTY1-1A	<i>MATa ura3-52 Δhis3-200 lys2-801 sec14-1^{ts}</i>	(Bankaitis <i>et al.</i> , 1989)
CTYD2	<i>MATa/α ura3-52/ura3-52 lys2-801//lys2-801 ADE2/ade2-101 TRP1/Δtrp1 Δhis3-200/Δhis3-200 sec14-3/sec14Δ1::HIS3</i>	V. Bankaitis
CTY588	<i>MATa ade2 ade3 leu2 Δhis3-200 ura3-52 sec14Δ1::HIS3/pCTY11†</i>	V. Bankaitis
S288C	<i>MATα mal2 gal2</i>	(Mortimer y Johnston, 1986)
<i>C. albicans</i>		
1006	<i>MPA1 ser57 ura3 lys1 arg4</i>	(Goshorn y Scherer, 1989)
WO-1	cepa silvestre, realiza la transición "white-opaque". aislado clínico	(Slutsky <i>et al.</i> , 1987)
1001	cepa silvestre de CECT, ATCC64385, aislado clínico	(Gil <i>et al.</i> , 1988)
92'	mutante morfológico incapaz de filamentar, cepa isogénica de 1001	(Nombela <i>et al.</i> , 1987)
SC5314	cepa silvestre. Parental de CAI4	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	(Fonzi y Irwin, 1993)

†El plásmido pCTY11 que porta la cepa CTY588 contiene un vector episómico de *S. cerevisiae* que incluye los genes *LEU2*, *ADE3* y *SEC14* de esta misma especie.

Tabla V. Cepas obtenidas en este trabajo.

Cepa	Genotipo
<i>C. albicans</i>	
CNC20	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 CaSEC14/Casec14Δ::hisG-CaURA3-hisG</i>
CNC21	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 CaSEC14/Casec14Δ::hisG</i>
CSC6-f	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 Casec14Δ::hisG/CaSEC14-CaURA3-SKBluescript-CaSEC14</i>
CSM1-l	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 Casec14Δ::hisG/Casec14-1-CaURA3-SKBluescript-CaSEC14</i>
CSM7-2	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 Casec14Δ::hisG/Casec14-7-CaURA3-SKBluescript-CaSEC14</i>
<i>S. cerevisiae</i>	
SSC01	<i>MATa ade2 ade3 leu2 Δhis3-200 ura3-52 sec14Δ1::HIS3/pCTY11† y pLM1</i>
SSC02	<i>MATa ade2 ade3 leu2 Δhis3-200 ura3-52 sec14Δ1::HIS3/pCTY11† y pYPIα</i>
SSC03	<i>MATa ade2 ade3 leu2 Δhis3-200 ura3-52 sec14Δ1::HIS3/pCTY11† y pYPIβ</i>
SSC11	<i>MATa ade2 ade3 leu2 Δhis3-200 ura3-52 sec14Δ1::HIS3/pLM1</i>
SSC12	<i>MATa ade2 ade3 leu2 Δhis3-200 ura3-52 sec14Δ1::HIS3/pYPIα</i>
SSC13	<i>MATa ade2 ade3 leu2 Δhis3-200 ura3-52 sec14Δ1::HIS3/pYPIβ</i>

† El plásmido pCTY11 que porta la cepa CTY588 contiene un vector episómico de *S. cerevisiae* que incluye los genes *LEU2*, *ADE3* y *SEC14* de esta misma especie.

El resto de los plásmidos aparecen en esta tabla se describen posteriormente en la tabla de plásmidos (tabla VII).

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Los medios eran líquidos o sólidos según las necesidades de cada experimento. A los medios descritos a continuación hay que añadirles 20 g/l de agar cuando se necesitan en forma sólida. Excepto en los casos indicados, estos medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C, durante 20'.

2.1. *S. cerevisiae*.

Las cepas de *S. cerevisiae* se crecieron en los siguientes medios de cultivo:

- YED: 10 g/l de extracto de levadura y 20 g/l de glucosa.
- YEPD: 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de glucosa y 20 g/l de peptona.
- MPE: 10 g/l de extracto de levadura, 30 g/l de extracto de carne y 50 g/l de glucosa.

-ME: 10 g/l de acetato potásico, 1 g/l de extracto de levadura y 0,25 g/l de glucosa.

-SD: 1,7 g/l de base nitrogenada para levaduras (Difco), 5 g/l de sulfato amónico, 20 g/l de glucosa y 70 ml/l de mezcla de aminoácidos.

-SG: 1,7 g/l de base nitrogenada para levaduras (Difco), 5 g/l de sulfato amónico, 20 g/l de galactosa, 20 g/l de rafinosa y 70 ml/l de mezcla de aminoácidos. La galactosa se esterilizó, separadamente, por filtración. En algunos casos se eliminó la rafinosa.

La composición de la **mezcla de aminoácidos** concentrada utilizada en la preparación de los medios SD y SG es:

147 mg/ml de adenina, uracilo, L-triptófano, L-histidina, L-arginina y L-metionina; 221 mg/ml de L-tirosina, L-leucina, L-isoleucina y L-lisina; 368 mg/ml de L-fenilalanina; y 736mg/ml de L-glutámico, L-aspártico, L-valina, L-treonina y L-serina.

Esta mezcla de aminoácidos puede variar según el experimento, así, en cada caso estaban ausentes de ella los aminoácidos utilizados en la selección de plásmidos o DNAs transformantes y se duplicaba la concentración de aminoácidos para los cuales eran auxótrofas las cepas que se iban a utilizar.

Las cepas de *S. cerevisiae* se incubaron, normalmente, a 24°C. Se utilizaba la temperatura de 37°C cuando se quería comprobar la termosensibilidad.

2.2. *C. albicans*.

Para el crecimiento de las cepas de *C. albicans* se utilizaron algunos de los medios de cultivo descritos para *S. cerevisiae*, como el YED y el SD, además de otros los que se describen a continuación:

-SD + mezcla de aa+ S 1 M: en las transformaciones de *C. albicans* mediante protoplastos los transformantes se sembraron en el medio de selección adecuado (normalmente SD + mezcla de aa carente de uracilo) y con Sorbitol 1 M como estabilizante osmótico.

-Medio de Lee: 0,2 g/l de sulfato magnésico, 2,5 g/l de fosfato dipotásico, 5 g/l de cloruro sódico, 5 g/l de sulfato amónico, 0,5 g/l de L-alanina, 1,3 g/l de L-leucina, 1 g/l de L-lisina, 0,1 g/l de L-metionina, 0,07 g/l de L-ornitina, 0,5 g/l de L-fenilalanina, 0,5 g/l de L-prolina y 0,5 g/l de L-treonina. Después de disolver estos componentes se comprueba que el pH sea cercano a 7, se autoclava y se le añade 25ml/l de una solución estéril de glucosa al 50% y 1ml/l de una solución estéril de biotina al 0,1% (Lee *et al.*, 1975).

-Suero de caballo (puro).

-Suero de ternera fetal (puro o al 10% en medio SD).

C. albicans se incubó a 30°C en la mayoría de las ocasiones y a 37°C y a 42°C cuando se buscaban mutantes termosensibles.

2.3. *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* que se incubaron rutinariamente a 37 °C, se crecieron en los siguientes medios suplementados con Ampicilina (100mg/ml) cuando era necesaria para la selección de plásmidos.

-LB (Luria-Bertani): 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, y 5 g/l de cloruro sódico.

-TB (terrific broth): 12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura y 4 ml de glicerol se disuelven en 900 ml y se autoclavan. Cuando se haya enfriado, se añaden en esterilidad 100 ml de una solución de fosfato monopotásico 0,17 M y fosfato dipotásico 0,72 M autoclavada por separado y fría.

3. ENSAYOS DE DE FILAMENTACIÓN.

Se inoculó un número de células entre $5 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^6$ células/ml, en 0,5 ml de medio inductor de la filamentación. Los cultivos se incubaron a 37°C y la morfología celular se observó a las 3 h, 8 h y 24 h. Los medios utilizados fueron: suero de caballo, suero de ternera fetal y medio de Lee.

La inducción de filamentación en medio sólido se realizó en Medio SD+10% de suero de ternera fetal. Tras sembrar 300 células por placa, estas se incubaron a 37°C hasta que el tamaño de las colonias era el adecuado para la observación de su morfología.

4. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.

4.1. Determinación de fosfatasa alcalina en medio sólido.

La medida de la liberación de la enzima intracelular fosfatasa alcalina al medio de cultivo se utilizó para la determinación de la lisis celular. Para su detección, se adicionó BCIP (bromo-cloro-indolil-fosfato, Sigma) al medio de cultivo sólido. Este reactivo se añadía al medio esteril y atemperado a 55°C en la cantidad necesaria para que quedara a una concentración de final de 40 mg/l. Después del crecimiento de las cepas en estas placas se detectaba una coloración azul en aquellas cepas cuyas células habían lisado y habían permitido la liberación al medio de la enzima que había hidrolizado el sustrato.

4.2. Determinación de actividad exoglucanasa en medio sólido.

Se detectó la secreción de esta enzima al medio de crecimiento. Las estirpes de *C. albicans* a ensayar se crecieron en placas de YED a 30°C durante dos días. Para la detección del enzima se les añadió una sobrecapa compuesta por: 50% de agarosa al 2% en tampón acetato potásico 50mM (pH 5,3) y 50% de solución de MUG (4-metil umbeliferil β -D-glucopiranosido) al 0,06 % disuelto en el mismo tampón. Una vez polimerizada la sobrecapa se incuban las placas a 30°C, durante 30 min y posteriormente se irradian con luz ultravioleta, que permitirá la visualización de fluorescencia blanca alrededor de las colonias productoras de exoglucanasa (Cid *et al.*, 1994). El halo de luz emitido es directamente proporcional a la cantidad de enzima producida por la cepa.

4.3. Determinación de fosfatasa ácida en medio sólido.

Para detectar, en cepas de *C. albicans*, la secreción de fosfatasa ácida al medio de crecimiento, se utilizó el método descrito por Meyhack y col. (Meyhack *et al.*, 1982), modificando el medio de cultivo. Como medio bajo en fosfatos se utilizó medio de Lee carente de fosfato dipotásico y con fosfato monopotásico en la concentración adecuada (10mg/l o 30mg/l). Las cepas se sembraron tanto en dicho medio como en YED (como control). Tras varios días de incubación se añadió una sobrecapa de agar de tinción. Este se prepara disolviendo agar (Difco) al 1% en tampón cítrico-citrato a pH=6, en el cual una vez atemperado a 45°C o 50°C se añade 2mg/ml Fast Garnet GBC en forma de sal de sulfato (Sigma) y 0,2 mg/ml de α -naftil-fosfato (Sigma). Al añadirse esta sobrecapa de agar sobre las cepas, estas se colorean desde amarillo hasta marrón oscuro en función de la actividad fosfatasa que se libere al medio.

5. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA Y PROTEÍNAS

Los métodos de manipulación de DNA que se han utilizado en el presente trabajo son los convencionales y se realizaron según se describen en los manuales clásicos de Biología Molecular (Ausubel *et al.*, 1993; Sambrook *et al.*, 1989). Se siguieron estos protocolos para:

- Extracción de DNA de *E. coli* y su posterior purificación.
- Análisis de restricción del DNA y ligaciones: las enzimas de restricción procedían de Boehringer-Mannheim, así como las enzimas DNA ligasa, DNA fosfatasa y Klenow.
- Preparación de geles de agarosa tanto analíticos como preparativos: la concentración de agarosa varió de 0,8% hasta 2% según los tamaños de la bandas que se analizaron. Los patrones de pesos moleculares también proceden de Boehringer-Mannheim.

Para la elución de DNA a partir de los geles de agarosa se utilizó el sistema comercial "GeneClean kit" (Bio101).

5.1. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados para la realización de este trabajo se describen en la tabla VI y los obtenidos o contruídos durante la misma están descritos en la tabla VII.

Tabla VI. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Huesped	Características	Fuente o ref.
pUC19	<i>Ec</i>	Resistencia a ampicilina.	(Ausubel <i>et al.</i> , 1993)
SK Bluescript	<i>Ec</i>	Resistencia a ampicilina.	Stratagene
pYEura3	<i>Ec/Sc</i>	Centromérico. Vector de expresión. Marcador <i>URA3</i> . Promotor GAL1/GAL10.	Clontech
YEp352	<i>Ec/Sc</i>	Episómico. Marcador <i>URA3</i> .	(Hill <i>et al.</i> , 1986)
pYES2	<i>Ec/Sc</i>	Episómico. Marcador <i>URA3</i> . Vector de expresión. Promotor GAL1.	Invitrogen Corporation
pJPDM19	<i>Ec/Ca</i>	ARS de <i>C. albicans</i> . Marcador <i>CaURA3</i> .	J.Pla/R.M. Pérez
pAN3	<i>Ec/Ca</i>	Dos ARS de <i>C. albicans</i> . Marcadores: <i>CaARG5,6</i> , <i>CaLEU2</i> y <i>CaURA3</i> .	(Negredo <i>et al.</i> , 1997)
pAN8	<i>Ec/Ca</i>	Dos ARS de <i>C. albicans</i> . Marcador <i>CaARG5,6</i> .	A.I. Negredo.

Las siglas que indican los huéspedes corresponden a: *Ec*: *E. coli*, *Sc*: *S. cerevisiae*, *Ca*: *C. albicans*.

Tabla VII. Plásmidos obtenidos durante la realización de este trabajo.

Nombre	Vector	Descripción
pLM1	YEp352	Proviene de la genoteca genómica de <i>C.albicans</i> 1001. Aislado en el rastreo con dicha genoteca. Inserto de 8 kb que incluye <i>CaSEC14</i> y zonas adyacentes del genoma (figura 12).
pLM13	YEp352	Aislado en el rastreo con la genoteca de <i>C.albicans</i> 1001.
pLM15	YEp352	Aislado en el rastreo con la genoteca de <i>C.albicans</i> 1001.
pLM19	YEp352	Aislado en el rastreo con la genoteca de <i>C.albicans</i> 1001.
pLM23	YEp352	Aislado en el rastreo con la genoteca de <i>C.albicans</i> 1001.
pLM25	YEp352	Aislado en el rastreo con la genoteca de <i>C.albicans</i> 1001.
pLM27	YEp352	Aislado en el rastreo con la genoteca de <i>C.albicans</i> 1001.
pLM1a	YEp352	Inserto: fragmento <i>HindIII-BamHI</i> de 4 kb de pLM1 (figura 12).
pLM1b	YEp352	Inserto: fragmento <i>HindIII-HindIII</i> de 4 kb de pLM1 (figura 12).
pCEN1	pYEura3	Inserto: fragmento <i>SpeI-SpeI</i> de 3,4 kb que incluye <i>CaSEC14</i> (figura12). Clonado en la diana <i>SpeI</i> de pYEura3. <i>CaSEC14</i> no queda bajo el control del promotor GAL1, sino que se encuentra regulado por su propio promotor.
pLY1	YEp352	Inserto: fragmento <i>EcoRI-EcoRI</i> de 2.1 kb que incluye el ORF de <i>CaSEC14</i> , excepto los 13 aa de extremo C-terminal y la zona 5' del genoma de <i>C. albicans</i> (figura12).
pLU1	pUC19	Inserto: igual que pLY1.
pLU2	pUC19	Plásmido similar a pLU1 pero con el inserto en orientación opuesta.
pLUIN	pUC19	Inserto: fragmento <i>Avall-BamHI</i> de 0.5 kb del interior <i>CaSEC14</i> .
(continúa)		

pSLK2	SK Bluescript	SK Bluescript al que se ha eliminado la diana <i>Bam</i> HI rellenándolo con el enzima Klenow y religando. Sin inserto.
pSLK3B	pSLK2	Inserto: fragmento <i>Spe</i> I- <i>Spe</i> I de 3.4 kb de pLM1 que incluye <i>CaSEC14</i> clonado en la diana <i>Spe</i> I de pSLK2.
pLIS4	pSLK2	Derivado de pSLK3B en el que se ha sustituido el fragmento <i>Av</i> alll- <i>Bam</i> HI de 0.5 kb del interior de <i>CaSEC14</i> por el fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> II que incluye la construcción <i>hisG-CaURA3-hisG</i> . La diana <i>Av</i> alll de <i>CaSEC14</i> se pierde mientras que <i>Bam</i> HI se regenera.
pSLK5B	pSLK2	Derivado de pSLK3B. En <i>Eco</i> RV se subclonó un fragmento <i>Sac</i> I- <i>Xba</i> I (de pJPDM19) relleno con Klenow, que contiene el gen <i>CaURA3</i> . <i>CaSEC14</i> y <i>CaURA3</i> en la misma orientación.
pSLK6	pSLK2	Derivado de pSLK5B al que se le ha eliminado la diana <i>Hind</i> III del sitio de clonación múltiple.
pLU2M1	pUC19	Obtenido en la mutagénesis dirigida. Similar a pLU2 pero <i>CaSEC14</i> se ha sustituido por <i>Casec14-1</i> (figura 26).
pLU2M7	pUC19	Obtenido en la mutagénesis dirigida. Similar a pLU2 pero <i>CaSEC14</i> se ha sustituido por <i>Casec14-7</i> (figura 26).
pSLK7M1	pSLK2	Derivado de pSLK6. El fragmento <i>Sty</i> I- <i>Bam</i> HI del <i>CaSEC14</i> se ha sustituido por el fragmento equivalente de <i>Casec14-1</i> obtenido de pLU2M1 (figura26).
pSLK7M7	pSLK2	Derivado de pSLK6. El fragmento <i>Sty</i> I- <i>Bam</i> HI del <i>CaSEC14</i> se ha sustituido por el fragmento equivalente de <i>Casec14-7</i> obtenido de pLU2M7 (figura26).
YEM1	YEp352	Subclonación del fragmento <i>Spe</i> I- <i>Spe</i> I de pSLK7M1 que contiene <i>Casec14-1</i> en <i>Xba</i> I de YEp352 (figura26).
YEM7	YEp352	Subclonación del fragmento <i>Spe</i> I- <i>Spe</i> I de pSLK7M7 que contiene <i>Casec14-7</i> en <i>Xba</i> I de YEp352 (figura26).
pSECAR	pUC19	Ligación del fragmento <i>Sac</i> I- <i>Cla</i> I de 7 kb de pAN8 (contiene <i>CaARG5,6</i> , pUC19 y una secuencia ARS) con el fragmento <i>Sac</i> I- <i>Cla</i> I de 4,85 k de pslk6 (contiene <i>CaSEC14</i> y <i>CaURA3</i>).
pYPI α	pYES2	Inserto: ORF de la proteína humana PITP α bajo el control del promotor GAL1 (figura 32).
pYPI β	pYES2	Inserto: ORF de la proteína humana PITP β bajo el control del promotor GAL1 (figura 32).

5.2. Genotecas.

Para la la complementación del mutante termosensible CTY1-1A y clonación del gen *CaSEC14* se utilizó una genoteca genómica de *C. albicans* 1001. Esta se contruyó en este Departamento (Navarro-García *et al.*, 1995) y está formada por fragmentos de entre 6 y 9 kb, procedentes de la restricción parcial del genoma de la mencionada estirpe con la enzima *Sau*3A, subclonados en la diana *Bam*HI de YEp352.

El molde utilizado en la amplificación de las PITPs humanas era una genoteca de cDNA de células Hela donada por el laboratorio del Dr. Guarante.

5.3. Transformación de DNA.

La transformación rutinaria de plásmidos y ligaciones en *E.coli* se realizó por el método de Hanahan (Hanahan, 1983), a excepción de los plásmidos extraídos de *S. cerevisiae* que se amplificaron por electroporación (Dower *et al.*, 1988). Esta electroporación se realizó con un aparato BTX 600 siguiendo las instrucciones del fabricante (condiciones: R=129 Ω , V=2400 V).

La electroporación fue utilizada también para transformar el mutante CTY1-1A de *S.cerevisiae* con la genoteca genómica de *C. albicans*, con unas condiciones de R=186 Ω y V=1400 V y siguiendo el método descrito en distintas referencias (Becker y Guarente, 1992; Becker y Guarente, 1991; Navarro-García *et al.*, 1995). En el resto de las ocasiones en que se transformó *S. cerevisiae* se utilizó el método de bicina (Dohmen *et al.*, 1991) o el de acetato de litio (Ito *et al.*, 1983).

Para las transformaciones de *C. albicans* se utilizó el método de protoplastos (Kurtz *et al.*, 1986).

5.4. Secuenciación de DNA y análisis de las secuencias.

Tabla VIII. Oligonucleótidos utilizados en secuenciación y PCR.

Nombre	Secuencia	Fluoresc.
M13UP*	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	No
M13RP*	CAGGAACAGCTATGAC	No
Luc1	TCACAAGCTACAAACATATCAATAGCTT	Si
Luc2pro	GGGATGGGATGAGAATGGCAAAA	Si
Luc3end	GATGTTTCTGATGACGATTTATT	Si
Luc4	TCACCGCTCCAACCGATCAAACA	Si
Luc5	ATGGAGAGATTTTGGTCTTA	Si
lsec1	GTCTAAGTAGTTGAACATTGATA	No
Ohg1†	GTTTTCCGCCATCGCAATCAGGC	No
Oura3crt	GTGTTACGAATCAATGGCAGTACAGC	No
amplisec	ACCTTCTGGACCAATCAATTCTG	No
oli3	TTGTCTGGTAAATTTTGAGGTGGG	No
olimut19	ATTGGTGATATGTCAGAT	No
1119ts	GACATATCACCAATTAAATT	No
PPlinic	CCCGGATCCATGGTGCTGATCAAGGA	No
PPI1fin	CGCGAATTCTTAGTCATCTGCTGTCAT	No
PPI2fin	CGCGAATTCTAGACATGAGCAGCCGA	No

*M13UP (universal primer de M13) y M13RP (reversal primer de M13). Estos oligonucleótidos hibridan cada uno a uno de los lados del sitio de clonación múltiple de pUC19. † Los oligonucleótidos así señalados fueron cedidos por M. L. Hernáez.

Para la secuenciación del locus *CaSEC14* se siguieron estrategias complementarias. Una de las cadenas de DNA se sometió al proceso de delecciones seriadas (utilizando el sistema "Double-stranded Nested deletion kit" de Pharmacia Biotech). Estas se realizaron sobre el plásmido pLU1 utilizando como extremo sensible el generado por el corte con

*Sma*I y como protegido el generado por el corte con la enzima *Pst*I (estas enzimas cortan en el sitio de clonación múltiple de pUC19, una a cada lado del inserto de pLU1). Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados a partir del oligonucleótido M13RP (tabla VIII). Para la secuenciación de la otra hebra, pLM1b, pLM1a y pLUIN se secuenciaron a partir de M13RP y/o M13UP. Además, se diseñaron los oligonucleótidos fluoresceinados Luc1, Luc2pro, Luc3end y Luc4 (tabla VIII). El DNA plasmídico de cada uno de los clones obtenidos para la secuencia se purificó con el sistema de columnas "Quiagen". La secuencia se realizó en la Unidad de Secuenciación Automatizada de DNA de la U.C.M., así como la síntesis de los oligonucleótidos (tanto los diseñados y utilizados para secuenciación como para PCR). Los resultados de la secuenciación fueron procesados mediante el programa informático PCGENE y las homólogías compartidas con resto de las secuencias de DNA y proteínas depositadas en las bases de datos se obtuvieron gracias al acceso a los programas FASTA, BLITZ y BLAST mediante Internet.

El diseño de los oligonucleótidos para que cumplieran las condiciones requeridas, tanto para la secuenciación, como para las amplificaciones por PCR, se realizó mediante el programa informático OLIGO 4.0 (Macintosh).

5.5. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

Los protocolos básicos utilizados en las amplificaciones por PCR pueden encontrarse tanto en los manuales de Biología Molecular (Ausubel *et al.*, 1993), como en libros más específicos (Erich, 1989; Innis *et al.*, 1990).

Se utilizó un termociclador "Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler". Los desoxinucleótidos eran de Boehringer-Mannheim. La enzima Taq polimerasa, los tampones y las sales utilizadas en la mayoría de los casos eran de Perkin Elmer/Roche, excepto en el caso de las amplificaciones de las PITPs humanas donde se utilizó la enzima, las sales y los tampones del sistema "Expand High Fidelity PCR System" (Boehringer-Mannheim) que introduce muy pocos errores.

Las condiciones de cada PCR se adaptaron a las necesidades de cada experimento y se describen en los pies de las figuras que muestran dichos experimentos. La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos en cada amplificación fue calculada mediante el programa OLIGO 4.0 y adaptada empíricamente.

El volumen total de la reacción fue de 100 μ l cuando se trataba de una PCR preparativa y de 10 μ l en las PCRs analíticas, en las que solo interesaba la aparición o no de una determinada banda.

5.6. Extracción de DNA de levaduras.

Para extracción de DNA plasmídico de *S. cerevisiae* se utilizó el método descrito por Lorincz que utiliza bolitas de vidrio para la rotura mecánica de las células (Lorincz, 1984).

5.7. Hibridación DNA-DNA.

Para la realización de la técnica de Southern blot o hibridación DNA-DNA se utilizó el método clásico (Ausubel *et al.*, 1993). La separación del DNA se realizó en geles de agarosa al 0,8% (excepto en la localización cromosómica de *CaSEC14*, ver punto siguiente), la transferencia se hizo monodireccional a membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer-Mannheim). Para el marcaje de la sonda y su posterior detección se utilizó el sistema de Boehringer-Mannheim de marcaje con digoxigenina: "Dig DNA labeling and detection kit". El método de detección utilizado fue colorimétrico en todos los casos excepto en el experimento de la localización cromosómica (ver punto siguiente). Las enzimas de restricción utilizadas para digerir el DNA genómico, así como la sonda utilizada en cada experimento de Southern se indican en las figuras correspondientes en el apartado de resultados. Todos los experimentos de hibridación DNA-DNA se realizaron en condiciones de elevada especificidad con una temperatura de hibridación de 68 °C.

5.8. Electroforesis de campo pulsante y localización cromosómica.

La preparación de las muestras para este tipo de electroforesis ya ha sido descrita (Gerring *et al.*, 1991). La separación de los cromosomas de *C. albicans* se realizó mediante CHEF utilizando un aparato "Gene Navigator Pulsed Field System" de Pharmacia con el electrodo hexagonal para adaptarlo al sistema CHEF. Las condiciones de separación utilizadas fueron: 80 V (pulso de crecimiento lineal de 120 segundos a 480 segundos durante 36 h y otro pulso de crecimiento lineal de 480 segundos a 900 segundos durante 48 horas).

Para la localización cromosómica del gen *CaSEC14* los cromosomas separados mediante electroforesis de campo pulsante se transfieren e hibridan con una sonda, al igual que en cualquier otra hibridación DNA-DNA. En nuestro caso, el Dr. F. Navarro nos cedió una membrana a la cual ya se habían transferido los cromosomas de las cepas 1001, 1006 y WO-1 de *C. albicans*. Esta se hibridó con una sonda formada por un fragmento *EcoRI-EcoRI* de 2.1 kb que incluye casi todo el ORF de *CaSEC14* y que coincide con el inserto de pLY1. La detección se realizó en este caso por quimioluminiscencia (con los reactivos del "Dig DNA labeling and detection kit" de Boehringer-Mannheim) por ser este sistema más sensible que la colorimetría. La técnica de separación de cromosomas y los mapas cromosómicos de distintas cepas de *C. albicans* que ayudan a la interpretación de los resultados han sido descritos anteriormente (Chu *et al.*, 1993; Magee *et al.*, 1988; Navarro-García *et al.*, 1995a).

5.9. Western blot.

Para la obtención de los extractos celulares de las cepas de *C. albicans* y *S. cerevisiae* se utilizó el método descrito en "Current protocols in molecular biology" que utiliza bolas de vidrio para la rotura de las células (Ausubel *et al.*, 1993).

La técnica de Western blot, o hibridación proteínas-anticuerpos, se realizó como se describe en "Molecular cloning: a laboratory manual" (Sambrook *et al.*, 1989). Para la electroforesis se utilizó el sistema vertical Protean II de Bio-Rad y se utilizó un gel de

poliacrilamida al 10%. Se utilizaron 400 µg de cada uno de los extractos, medidos con un espectrofotómetro a 280 nm. La transferencia se realizó con la cubeta "Trans-Blot Cell" de Bio-Rad que utiliza un sistema húmedo y la proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa ("Hybond" ECL). La detección se realizó por el sistema quimioluminiscente ECL detection (Amersham. Life Science) que utiliza segundos anticuerpos conjugados con peroxidasa.

Los anticuerpos utilizados para la hibridación con Sec14p (de *C. albicans* y *S. cerevisiae*) fueron anticuerpos policlonales anti-Sec14p de *S. cerevisiae* cedidos por el laboratorio del Dr. V. Bankaitis.

5.10. Mutagénesis dirigida.

Se utilizó el método de introducción de mutaciones puntuales mediante PCR que se describe en "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al.*, 1993). Se diseñaron 2 oligonucleótidos: ① OLIMUT19: introduce la misma mutación que en *SEC14* de *S. cerevisiae* le produce, a esta levadura, un fenotipo termosensible (tabla VIII y figuras 24 y 26) y amplifica una banda de 151pb con M13RP utilizando para ello como molde pLU2; y ② OLI3: (tabla VIII y figuras 24 y 26) que amplifica una banda de 2,1kb con el M13UP sobre el mismo plásmido. Las bandas resultantes de la amplificación se trataron con Klenow, para eliminar las adeninas libres del inicio de los productos de PCR, dejando así extremos romos y se cortaron con *HindIII* y *EcoRI*, respectivamente, para su posterior subclonación simultánea en pUC19 cortado con las mismas enzimas (figura 26). Con esta estrategia se trataba de conseguir un plásmido idéntico a pLU2 excepto por la mutación puntual que habríamos introducido de forma dirigida.

5.11. Análisis de fragmentos pequeños de DNA en geles de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida para analizar fragmentos pequeños de DNA se realizaron según un protocolo descrito anteriormente (Sambrook *et al.*, 1989). El porcentaje de acrilamida utilizó en los geles de estos experimentos fue del 13,5 %. Una cantidad 10 veces mayor a la utilizada normalmente en los análisis de restricción de cada uno de los plásmidos se digirió con las enzimas de restricción *StyI* y *BamHI* y se trató, simultáneamente, con RNAasa. El gel corrió a 44 v durante toda la noche y se tiñó con bromuro de etidio para su observación.

6. INTERRUPCIÓN DE GENES DE *C. albicans*.

Para la interrupción del gen *CaSEC14* de *C. albicans* se utilizó el sistema descrito por los Drs. Fonzi e Irwin (Fonzi y Irwin, 1993). Se modificó ligeramente el proceso seguido para forzar la expulsión del marcador *CaURA3* y seleccionar, posteriormente, las cepas con fenotipo Ura⁻. Una de las modificaciones es la incubación de la cepa, en la que se fuerza la expulsión, durante 48 h previas al la siembra en medio con 5-FOA, en YED líquido suplementado con uridina. También se varió la concentración de 5-FOA (se usó a 0,5 mg/ml) y de uridina (se utilizó a 25µg/ml) en el medio de selección de los clones Ura⁻. Este medio fue SD+mezcla de aminoácidos sin uracilo+5-FOA+uridina.

Los distintos pasos seguidos a lo largo de todo el proceso de interrupción se comentan en los resultados.

7. EXPERIMENTOS DE INTERCAMBIO DE PLÁSMIDOS.

S. cerevisiae CTY588 que se transformó con distintos plásmidos con el gen *URA3* como marcador y se forzó la expulsión del plásmido pCTY11, con marcador *LEU2*, que porta esta cepa.

Para forzar la expulsión de pCTY11 un transformante Ura⁺, con ambos plásmidos, se creció en el medio líquido adecuado con doble cantidad de leucina y carente de uracilo (también se añadió al medio triple cantidad de adenina). Se mantuvo el crecimiento en fase exponencial durante 5 días, para lo que se realizaron diluciones diarias del cultivo (50 µl de cultivo en 75 ml de medio nuevo). Posteriormente, se sembraron aproximadamente 1800 células, en 3 placas del mismo medio en el que estaba creciendo, y, tras incubárlas el tiempo necesario para que las colonias alcanzaran el tamaño adecuado, se replicaron en medio carente de leucina. Se seleccionaron aquellas colonias con fenotipo Leu⁻.

8. SEGREGACIÓN MEIÓTICA.

Se realizó en cepas obtenidas de la transformación del diploide de *S. cerevisiae* CTYD2. La segregación de caracteres tras la esporulación de estas estirpes se llevó a cabo mediante micromanipulación. El micromanipulador utilizado es un modelo Leitz acoplado a un microscopio Wild Heerbrugg. La esporulación se realizó creciendo las estirpes en medio de preesporulación (MPE) durante 24 h y la posterior incubación de éstas en medio de esporulación (ME) durante 14 días a 24 °C. La recuperación de las esporas se llevaba a cabo sobre láminas finas de agar YEPD fabricadas sobrecubreobjetos de 24-36 cm.

RESULTADOS

1. CLONACIÓN DE GENES DE *C. albicans* QUE COMPLEMENTAN LA MUTACIÓN *sec14^{ts}* DE *S. cerevisiae*.

Una de las estrategias más utilizadas para clonar genes de *C. albicans* es la complementación de mutantes de *S. cerevisiae* con defectos en el gen de interés (Pla *et al.*, 1996). Con el objeto de comprobar si existía en el genoma de *C. albicans* de gen homólogo funcional al gen *SEC14* de *S. cerevisiae* y, en su caso, clonarlo, se trató de complementar el fenotipo termosensible del mutante de secreción de *S. cerevisiae* CTY1-1A (*sec14^{ts}*) con una genoteca genómica de una cepa silvestre de *C. albicans* (*C. albicans* 1001) en el plásmido multicopia YEp352. Era de esperar que si realmente existía el homólogo a *SEC14*, a pesar de ser un gen heterólogo, en un plásmido multicopia pudiera complementar el defecto de crecimiento de la cepa CTY1-1A a 37 °C.

1.1. Estudio de las características fenotípicas del mutante CTY1-1A de *S. cerevisiae*.

Antes de proceder a la transformación del mutante CTY1-1A, se comprobaron sus características fenotípicas.

Se estudió su **fenotipo termosensible** midiendo la capacidad de crecimiento tanto a 24 °C como a 37 °C. Para ello, el mismo número de células se sembró en distintas placas de YED que fueron incubadas a ambas temperaturas. Aproximadamente, un 10 % de las células presentaba cierto crecimiento a 37 °C, llegando a formar colonias que siempre eran de un tamaño menor que el de las colonias crecidas a 24 °C. La observación de que un porcentaje de células tan elevado podía presentar cierto crecimiento a la temperatura restrictiva llevó a decidir que las condiciones de selección de los transformantes del posterior rastreo con la genoteca deberían ser muy restrictivas, por lo que dicha selección se realizaría directamente a 37 °C. También se buscaron posibles criterios complementarios para discernir entre los transformantes reales y los posibles falsos positivos. Estos criterios fueron:

-Lisis celular a 37 °C. Se analizó mediante la valoración de la enzima intracelular fosfatasa alcalina en medio sólido. Las colonias del mutante sembradas en SD+BCIP e incubadas a 37 °C, en caso de que consiguieran crecer, a los 4 días presentaban una coloración azul producida al hidrolizarse el BCIP por la fosfatasa intracelular. A diferencia de las anteriores, las colonias de una cepa silvestre de *S. cerevisiae* (TD28) crecidas en las mismas condiciones presentaban una coloración totalmente blanca. Esto indica que, aunque cierta proporción de las células del mutante CTY1-1A puede comenzar a crecer a 37 °C, después de varias generaciones estas células se lisan. Mediante este ensayo sería posible distinguir entre colonias del mutante termosensible y aquellas en las que dicha mutación se encuentre complementada.

-Bloqueo en la secreción de proteínas a 37 °C. Utilizamos como criterio la diferencia en la secreción de exoglucanasa (medida en YED sólido con sobrecapa de MUG) entre el mutante y la cepa silvestre TD28, a dicha temperatura. Aunque el método de detección no permite cuantificar, se observó una reducción de la señal producida por el mutante con respecto a la producida por la cepa parental, lo que también permitiría discernir claramente entre las colonias mutantes y aquellas con el fenotipo complementado por algún gen de la genoteca.

1.2. Condiciones de electroporación.

Como método de transformación para rastrear el mutante *sec14^{ts}* con la genoteca de *C. albicans* se eligió la electroporación. Con este método se obtienen frecuencias muy elevadas de transformación y es relativamente sencillo conseguir el número de transformantes necesario para representar toda una genoteca.

Previamente al rastreo, se llevó a cabo una electroporación preliminar para ajustar las condiciones del pulso eléctrico de manera que la eficiencia fuera lo más elevada posible. Se realizaron pruebas utilizando las siguientes condiciones:

- Resistencia de 186 Ω . Descrita anteriormente para rastreos en *S. cerevisiae* (Navarro-García *et al.*, 1995).
- Voltaje desde 500 V hasta 1900 V a intervalos de 100 o 200 V.

El número de transformantes obtenido con igual cantidad de DNA transformante (una pequeña alícuota de la genoteca) fue aumentando desde 2 colonias (500 V) hasta 570 colonias cuando el pulso eléctrico aplicado fue de 1400 V, y volvió a disminuir al continuar incrementando el voltaje aplicado. De esta manera, se comprobó que 1400 V era el voltaje más adecuado y que en estas condiciones (186 Ω , 1400 V y 5 ms de duración del pulso eléctrico) se obtenían aproximadamente 10^5 transformantes por μ g de DNA.

1.3. Rastreo del mutante CTY1-1A con una genoteca de *C. albicans*. Clonación de pLM1, pLM13, pLM15 y pLM19.

La cepa CTY1-1A se transformó con la genoteca genómica de *C. albicans* 1001. Los transformantes fueron incubados directamente en medio selectivo y a la temperatura restrictiva de 37 °C (excepto pequeñas alícuotas de la transformación incubadas a 24 °C para poder estimar el número de transformantes obtenidos). De esta forma, se seleccionaron, de entre las 423.000 colonias rastreadas, 38 clones que crecieron a 37 °C entre el 3^{er} y 6^o día de incubación.

Los plásmidos de los 38 transformantes se extrajeron mediante bolas de vidrio y se amplificaron en *E. coli* mediante el método de Hanahan o electroporación. Siete plásmidos, denominados pLM1, pLM13, pLM15, pLM19, pLM23, pLM25 y pLM27, fueron analizados inicialmente. En primer lugar, mediante sus patrones de restricción, se comprobó que todos

ellos portaban inserto. Posteriormente, se estudió si dichos insertos complementaban realmente el fenotipo termosensible mutante CTY1-1A, para lo cual este mutante se retransformó con dichos plásmidos. Las placas de la retransformación fueron incubadas directamente a 37°C y se obtuvieron los siguientes resultados:

pLM1: A los 3 días se observaban colonias muy grandes.

pLM13, pLM15 y pLM19: A los 5 días se observaban colonias menores que las anteriores.

pLM23, pLM25 y pLM27: no se observó crecimiento.

El análisis de restricción de los plásmidos que complementaban el fenotipo termosensible de CTY1-1A (pLM1, pLM13, pLM15 y pLM19) con la enzima *Hind*III, permitió comprobar que los insertos de pLM13, pLM15 y pLM19 correspondían a regiones solapantes del genoma, por lo que podía tratarse de un solo gen que estuviera suprimiendo el defecto de crecimiento en los tres casos. El patrón de restricción del plásmido pLM1 indicaba que se trataba de una zona diferente del genoma y, por tanto, portaba un segundo gen que también complementaba la mutación. Estos resultados concordaban perfectamente con el distinto grado de complementación del mutante termosensible (indicado por la diferente velocidad de crecimiento observada anteriormente) de los distintos plásmidos seleccionados (figura 11).

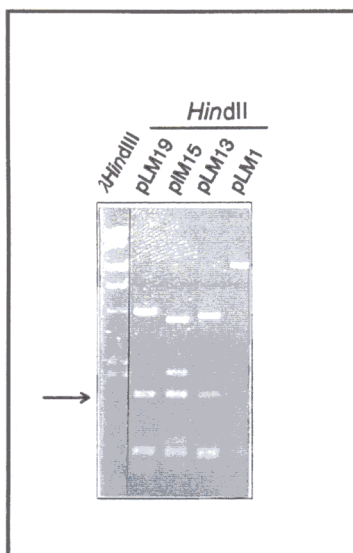


Figura 11. Análisis de restricción de los distintos plásmidos aislados de la genoteca de *C. albicans* 1001 y que complementan el defecto de crecimiento a 37°C del mutante CTY1-1A: pLM1, pLM13, pLM15 y pLM19. La flecha indica una banda común a los plásmidos pLM13, pLM15 y pLM19. (Las bandas de tamaños menores a la indicada y que son comunes a todos los plásmidos son fragmentos del vector YEp352).

Debido a que los datos indicaban que habíamos clonado, al menos, dos genes que complementaban la mutación *sec14^{ts}* de *S. cerevisiae*, se profundizó en el estudio de sus características.

La elevada capacidad de complementación de pLM1 sugería que, probablemente, portaba el gen homólogo a *SEC14* de *S. cerevisiae*, mientras que en los otros tres plásmidos podría haber un gen supresor en multicopia de la mutación *sec14^{ts}*.

2. CaSEC14: CARACTERIZACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ESTUDIO FUNCIONAL.

2.1. Mapa de restricción y estudio la complementación de diversos fragmentos del inserto de pLM1.

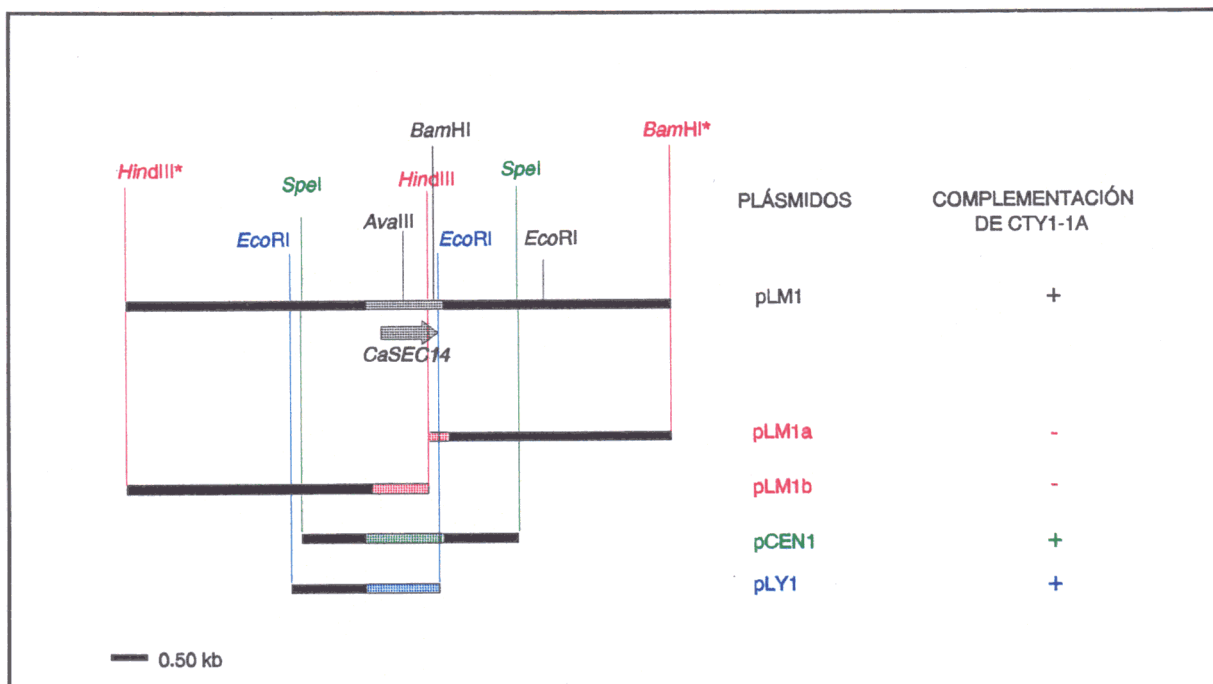


Figura 12. Mapa de restricción del *locus CaSEC14* y estudio de la capacidad de distintos subfragmentos de éste de complementar el fenotipo termosensible de la cepa CTY1-1A. Las zonas punteadas representan el ORF de *CaSEC14*. La complementación se analizó transformando la cepa CTY1-1A con cada uno de los plásmidos indicados (estos plásmidos se describen en la tabla VII). Las enzimas de restricción marcadas con un asterisco provienen del sitio de clonación múltiple del vector YEp352 y no del DNA genómico. El código de colores sirve simplemente para aclarar qué dianas de restricción se han utilizado en la construcción de cada plásmido y qué zona del ORF porta cada uno de ellos.

Se realizó un análisis de restricción del plásmido pLM1 para localizar en su inserto de 8 kb el ORF que le confería la capacidad de complementación del fenotipo termosensible del mutante CTY1-1A. De esta forma, se localizó una diana *HindIII* que dividía el inserto en dos fragmentos de 4 kb cada uno y que se utilizó para construir los plásmidos pLM1a y pLM1b. El estudio de la capacidad de estos nuevos plásmidos de complementar el mutante permitió comprobar que ninguno de ellos continuaba complementando el fenotipo termosensible. Esto indicaba la probable rotura del marco abierto de lectura del gen clonado (figura 12). Para ratificarlo, se comenzó la secuenciación del inserto en ambas direcciones a partir de la mencionada diana *HindIII*. La secuencia de 600bp obtenida codifica un polipéptido que, al enfrentarlo con las bases de datos (EMBL, GenBank), mostró un 77 % de homología con la proteína Sec14p de *K. lactis* y *S. cerevisiae*. Este dato indicó claramente que, como se pretendía en un principio, se había clonado el gen de *Candida albicans* homólogo al gen *SEC14* de *S. cerevisiae*. Este nuevo gen se llamó *CaSEC14*.

2.2. *CaSEC14* proviene del genoma de *C. albicans*.

Debido a los posibles fenómenos de recombinación de los plásmidos de la genoteca, tanto en el proceso de electroporación de *S. cerevisiae* como en su amplificación en *E. coli*, se quiso comprobar que el gen aislado pertenecía efectivamente al genoma de *C. albicans*. Para ello, mediante un experimento de hibridación DNA-DNA con una sonda del gen clonado, se detectó la presencia de dicho gen en los DNAs genómicos de *C. albicans* 1001 (cepa origen de la genoteca), *C. albicans* CAI4 (cepa utilizada en la posterior interrupción del gen) y *S. cerevisiae* CTY1-1A (mutante complementado en el rastreo de la genoteca) (figura 13). La mayor intensidad de las bandas obtenidas en las estirpes de *C. albicans* indican claramente que el gen clonado procede del genoma de *C. albicans*. En *S. cerevisiae* aparecen dos bandas, ambas de bastante intensidad. Este resultado no es de extrañar, ya que en el genoma de este organismo existen dos genes muy homólogos a *CaSEC14*. Estos genes son *SEC14* que se detectaría en la banda de 4 kb, que es la de mayor intensidad, y el ORF denominado *YKL091c* (gen muy homólogo a *SEC14* de función desconocida) que se detectaría en la banda menor. Este experimento también se realizó con DNA genómico extraído de *E. coli* MC1061 y no se detectó ninguna banda de hibridación (no se muestra en la figura).

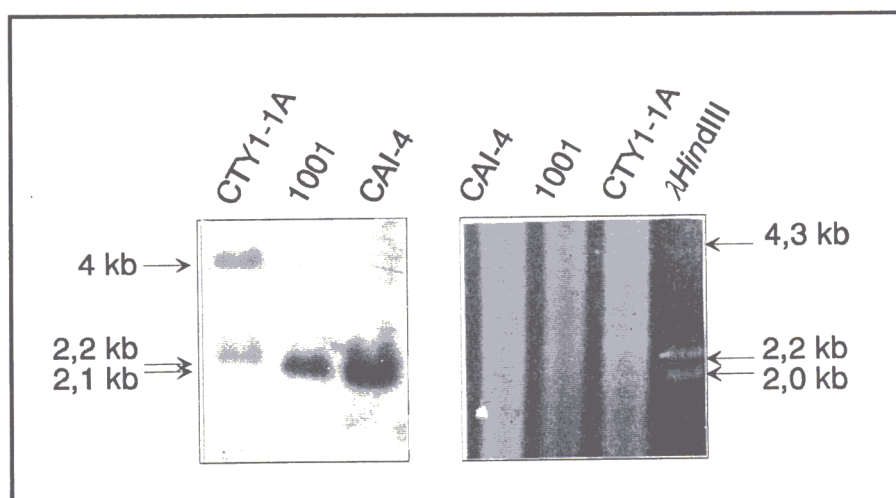


Figura 13. *CaSEC14* proviene del genoma de *C. albicans*. Análisis por Southern blot. El DNA genómico procedente de las cepas de *C. albicans* CAI4 y 1001 y de *S. cerevisiae* CTY1-1A se digirió con *EcoRI*. La sonda utilizada es un fragmento *EcoRI-EcoRI* de 2,1 kb de pLM1 que comprende casi todo el gen *CaSEC14* y la zona del genoma adyacente a éste en 5' (es el mismo fragmento que el inserto del plásmido pLY1, ver figura 12). A la izquierda, se muestra la membrana del Southern blot y a la derecha, el gel con los DNA genómicos de las distintas cepas antes de ser transferido a la membrana. Se señalan con flechas: a la izquierda, los pesos moleculares de las bandas de hibridación detectadas tanto en las cepas de *C. albicans* como en la de *S. cerevisiae*; a la derecha, los tamaños de las bandas del marcador de pesos moleculares λ HindIII. Ambas fotos están a la misma escala.

2.3. Detección de un gen homólogo a *CaSEC14* en el genoma de *C. albicans*.

Es de destacar, que en todas las hibridaciones de DNA genómico de *C. albicans* en las que se utilizaba la misma sonda *EcoRI-EcoRI* (que la utilizada en el experimento de la figura 13) se detectaba, en condiciones de elevada especificidad, otra banda de menor intensidad con un tamaño de 6 kb (esta banda no se observa en la figura 13 por ser de un tamaño mayor a la zona de la membrana que aparece en dicha foto). Este dato apunta a la existencia de otro gen cuya secuencia comparta una homología significativa con la del gen *CaSEC14*. Para corroborar esta hipótesis, el DNA genómico de *C. albicans* CA14 fue digerido con otras enzimas de restricción (figura 14) y, tras su hibridación con la misma sonda, se comprobó que se observaba, en todos los casos, además de la banda correspondiente a *CaSEC14*, otra banda de menor intensidad. En el caso de la digestión con *SpeI* se observaron dos bandas de poca intensidad, lo que indicaba la existencia de esta diana dentro del *locus* que se detectaba. Se podría pensar que en dicha banda se está detectando un gen homólogo a la zona de la sonda que no es *CaSEC14*, pero en casos en que se ha utilizado una sonda constituida por una zona interna del ORF de *CaSEC14* también se detectó, además de la banda correspondiente a *CaSEC14*, otra banda de menor intensidad (no mostrado). Esto corrobora la existencia en el genoma de *C. albicans* de otro *locus* que compartiría una homología de secuencia bastante importante con *CaSEC14* (figura 14; ver además la figura 22, ya que en ella también se detecta y se señala esa segunda banda de hibridación).

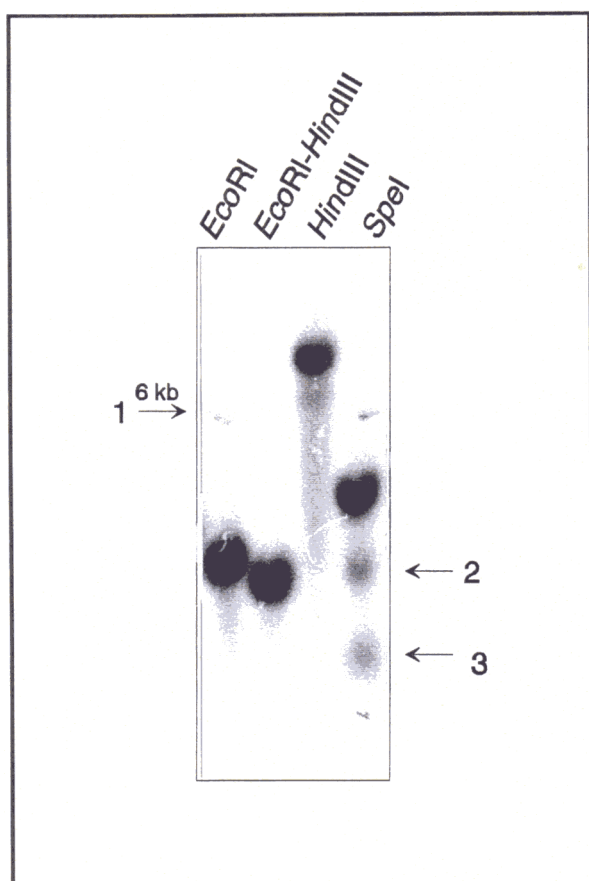


Figura 14. Detección de un gen homólogo a *CaSEC14* en el genoma de *C. albicans*. Para el Southern blot, el DNA genómico de *C. albicans* CA14 se digirió con las enzimas de restricción indicadas y como sonda se utilizó el mismo fragmento *EcoRI-EcoRI* de 2,1 kb que en el experimento de la figura 13. Se utilizaron condiciones de hibridación de alta especificidad (68 °C). Las flechas señalan la altura a la que se encuentra las bandas de hibridación en las que se detecta el gen homólogo a *CaSEC14* (distintas a las bandas en las que se detecta *CaSEC14* que corresponde con la banda más intensa de cada carril) 1: Altura de esa banda en los carriles en los que se han utilizado las enzimas *EcoRI*, *EcoRI* y *HindIII* o *HindIII*, 6 kb (la banda no se observa bien ya que se ha difuminado al ampliar la foto, pero se puede observar más claramente en la figura 22, en la que también se ha señalado). 2 y 3: Altura de las bandas en el carril en se utiliza *SpeI*.

2.4. *CaSEC14* en monocopia complementa la mutación *sec14* termosensible de *S. cerevisiae*.

Para ratificar que el gen clonado se trataba de *CaSEC14* (como también se comprobaría posteriormente mediante su secuenciación) y no de un posible gen supresor en multicopia del fenotipo termosensible, se construyó el plásmido centromérico pCEN1. Éste porta un fragmento que comprende todo el ORF del gen *CaSEC14* en el vector centromérico pYEura3 (tabla VII). La transformación del mutante termosensible de *S. cerevisiae* permitió comprobar que la complementación con una sola copia del gen de *C. albicans* era igual que cuando se encontraba en un vector multicopia (pLM1), ya que los dos tipos de transformantes crecieron a 37°C a igual velocidad (ver figura 12). Este dato y los obtenidos posteriormente con las homologías de las secuencias indican que *CaSEC14* es el homólogo del gen *SEC14* de *S. cerevisiae* en la levadura patógena *C. albicans*.

2.5. Secuenciación y análisis de la secuencia.

Con el objeto de conocer la secuencia nucleotídica del gen clonado, se realizaron delecciones seriadas en la hebra codificante del plásmido pLU1 (ver materiales y métodos, punto 5.4). También se diseñaron oligonucleótidos fluoresceinados (Luc1, Luc2pro, Luc3end y Luc4; tabla VIII) para la secuenciación de aquellas zonas de ambas hebras del DNA que no se podían secuenciar con las construcciones obtenidas hasta el momento (pLM1a, pLM1b, pLU1 y delecciones seriadas). De esta forma, se pudo determinar la secuencia de un fragmento de 1330 pb (figura 15) que contiene el gen *CaSEC14*. Dicha secuencia ha sido depositada en la base de datos de secuencias de nucleótidos del EMBL ("The EMBL Nucleotide Sequence Database") donde le ha sido asignado el número de acceso X81937.

2.5.1. Características de la secuencia de nucleótidos.

En dicha secuencia de nucleótidos se puede observar, además del marco abierto de lectura del gen *CaSEC14* formado por 903 pb, las señales propias de todos los genes de levadura. Así, en la zona promotora, que es muy rica en timinas, se han señalado varias posibles cajas TATA, además de una posible señal Cap con igual secuencia que la descrita como secuencia consenso para el factor de elongación 3 (Myers *et al.*, 1992). Hay que hacer notar que en la secuencia de la zona 3' después del codón de parada, se observa una zona muy característica compuesta solamente de citosinas y adeninas, con la repetición de la secuencia de bases CA más de 20 veces. También se pudo localizar, desde la base 1369 hasta la base 1403 (no mostrado en la figura 15), una secuencia de terminación de la transcripción, TAG...TAGT...TTA, igual a la descrita para el gen *TMP1* de *C. albicans* (Singer *et al.*, 1989) y que corresponde con la secuencia consenso propuesta por Zaret y Sherman (Zaret y Sherman, 1982).

A diferencia del gen *SEC14* de *S. cerevisiae*, en *CaSEC14* no se observan señales de procesamiento de intrones, indicando que el gen de *C. albicans* carece de ellos.


```

TATCTTAGTTAATCTTTTTTCTATTATCTACTACTACAAAACATATTTGAGTTTTCAATC 60
TTTTTAGTTGTTGTTTCTTTTTTTTTTTTGCCTTGTTCTTTTCACACACACACAGTAGA 120
CACACCCACACAGTTTCAACTTTCATTGCTTTTTTTTTCTTTGCTTTCTGTTTTTTTTTTT 180
TTTCAATATCCTCTCTTTTTTTTCCCTTCTTCTTTTATAAAACTTGTTTATTCCTGTTGTA 240
TTTTCAAATTTGATTTATATATCATCTTTTATTTGGATACACAATTTTGATAATATATAG 300
TCCTATCTCATCCCATCTTTTGCCATTCTCATCCCATCCCACTAAATGACTACGATGACT 360
                                M T T M T

ACTGAAGAAATATTGGCTTCTTATCCACAAATCACCGCTCCAACCGATCAAACAGGTTAC 420
T E E I L A S Y P Q I T A P T D Q T G Y

ACATCAAATTTAACACCTGAACAAAAAACCCTTTAGATATATTCAGACAACAATTAACT 480
T S N L T P E Q K T T L D I F R Q Q L T

GAATTGGGTTATAAAGACAGATTAGATGATGCATCACTTTTAAGATTTCTTAGAGCAAGA 540
E L G Y K D R L D D A S L L R F L R A R

AAATTTGATATTCAAAAAGCTATTGATATGTTTGTAGCTTGTGAAAAATGGAGAGAAGAT 600
K F D I Q K A I D M F V A C E K W R E D

TTTGGTGTTAATACCATTTTAAAGATTTCCATTATGAAGAAAAACCCATTGTTGCTAAA 660
F G V N T I L K D F H Y E E K P I V A K

ATGTATCCAACTTATTATCATAAAAGCTGATAAAGATGGTCCGTCAGTTTATTTTGAAGAA 720
M Y P T Y Y H K T D K D G R P V Y F E E

TTGGGTAAAGTTGATTTAGTGAAAATGTTGAAAATCACTACTCAAGAACGTATGCTTAAA 780
L G K V D L V K M L K I T T Q E R M L K

AACTTGGTATGGGAATATGAAGCCATGTGTCAATATCGTTTACCTGCATGTTCAAGAAAA 840
N L V W E Y E A M C Q Y R L P A C S R K

GCTGGTTATTTAGTGGAAGCTTCTTGTACTGTGTTAGATTTACTGGGTATTAGTGTGACT 900
A G Y L V E T S C T V L D L S G I S V T

TCAGCTTATAATGTCATTGGTTATGTTAGAGAAGCTTCAAAAATTGGTCAAGATTATTAT 960
S A Y N V I G Y V R E A S K I G Q D Y Y

CCAGAAAGAATGGGTAAATTTTATTTGATTAATGCTCCATTTGGGTTTTCTACTGCATTT 1020
P E R M G K F Y L I N A P F G F S T A F

AAATTATTTAAACCATTTTTTGGATCCAGTGACTGTTTCTAAAATTCATATTTTAGGTTAT 1080
K L F K P F L D P V T V S K I H I L G Y

AGTTATAAAAAAGAATTATTGAAACAAATCCCACCTCAAATTTACCAGTCAAATTTGGT 1140
S Y K K E L L K Q I P P Q N L P V K F G

GGTATGTCAGATGTTTCTGATGACGATTTATTATTAAAAGATGTTGGTCCTTGGAGAGAT 1200
G M S D V S D D D L L L K D V G P W R D
↓
CCAGAATTCATTGGTCCAGAAGGTGAATGTCCTAGAGCTTATAACATTTAATCATATACA 1260
P E F I G P E G E C P R A Y N I -

CGTACACACACACAAACATACATACACCAACACACACACACACACCACGCACACCACA 1320
CACAAGCACC 1330

```

Figura 15. Secuencia nucleotídica del gen *CaSEC14* y secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica. Se muestran dos posibles cajas TATA, señaladas en negrita; una posible señal Cap, subrayada con dos líneas; el codón CTG que se traduce por serina y según el código universal sería leucina (aminoácido 180), subrayado; y el nucleótido por el cual corta la enzima de restricción *EcoRI*, indicado con una flecha.

CaSec14p	MTTMTTEEILASYPQITAPTDTQGYTSNLTPEQKTTLDIFRQQLTELGYK	50
ScSec14p	MVTQQEKEFLESYPQNCPPDALPGTTPGNLDSAQEKALAE LRKLLDAGFI	50
CgSec14p	MVS--EAEFLASYPQKCPAGSLPGTTPGNTDEAQEGALKQLRSELEAAGFK	48
KlSec14p	MVSEQE--ILESYPQVCPGSLSGTTPGNLDSEQEAKLKEFRELLES LGTK	48
YKJ1p	MTT----SILDTPQICSPNALPGTTPGNLTKEQEEALLQFRSILLEKNYK	46
SpSec14p	M---SETISDPYPLTNPNAPL-GHPGHLNSTQQATLDSMRLELQKLGYT	45
	* . . . ** . . . * * . * . * .	
CaSec14p	DRLDDASLLRFLRARKFDIQKAIDMFVACEKWREDFGVNTILKDFHYE--	98
ScSec14p	ERLDDSTLLRFLRARKFDVQLAKEMFENCEKWRKDYGTDTILQDFHYD--	98
CgSec14p	ERLDDSTLLRFLRARKFDVALAKEMFENCEKWRKEYGTNTIMQDFHYD--	96
KlSec14p	ERLDDSTLLRFLRARKFDLEASKIMYENCEKWRKEFGVDTIFEDFHYE--	96
YKJ1p	ERLDDSTLLRFLRARKFDINASVEMFVETERWREEYGANTIIEDYENNKE	96
SpSec14p	ERLDDATLLRFLRARKFNLQQSLEMFIKCEKWRKEFGVDDLIKNFHYD--	93
	.****.*****. . . . * . * . * . *	
CaSec14p	----EKPIVAKMYPTYHKTDKDGRVPVFEELGKVDLVKMLKITTQERML	144
ScSec14p	----EKPLIAKFYPQYYHKTDKDGRVPVFEELGAVNLHEMNKVTSEERML	144
CgSec14p	----EKPLVAKYYPQYYHKTDKDGRVPVFEELGAVNLTEMEKITTQERML	142
KlSec14p	----ENTLVAKYYPQYYHKTNDGRVPVFEELGSVNLTMQYKITTQERML	142
YKJ1p	AEDKERIKLAKMYPQYYHVDKDGRLPYFEELGGINLKKMYKITTEKQML	146
SpSec14p	----EKEAVSKYYPQFYHKTIDGRVPVFEELGNIDLKKLYQITTPERM	139
	* . . * ** . * . * * . * . * . * . * . * . * .	
CaSec14p	KNLVWEYEAMCQYRLPACSRKAGYLVETSCTVLDLSGISVTSAYNVIGYV	194
ScSec14p	KNLVWEYESVVQYRLPACSRAGHLVETSCTIMDLKGISISSAYSVMYSV	194
CgSec14p	KNLVWEYESVVNYRLPACSRAGYLVETSCTVMDLKGISISSAYSVLSYV	192
KlSec14p	KNLVWEYEA FVRYRLPACSRKAGYLVETSCTILDLKGISISSAAQVLSYV	192
YKJ1p	RNLVKEYELFATYRVPACSRAGYLIETSCTVLDLKGISLSNAYHVL SYI	196
SpSec14p	QNLVYEYEMLALKRFPACSRKAGGLIETSCTIMDLKGVGITSIHVSYSYI	189
	.*** ** . * . * . * . * . * . * . * . * . * .	
CaSec14p	REASKIGQDYPERMGKFYLINAPFGFSTAFKLFKPFDPVTVSKIHLG	244
ScSec14p	REASYISQNYPERMGKFYLINAPFGFSTAFRLFKPFDPVTVSKIFILG	244
CgSec14p	REASYISQNYPERMGKFYLINAPFGFSTAFRLFKPFDPVTVSKIFILG	242
KlSec14p	REASNIGQNYPERMGKFYLINAPFGFSTAFRLTKPFDPVTVSKIFILG	242
YKJ1p	KDVADISQNYPERMGKFYLIIHSPFGFSTMFKMVKPFDPVTVSKIFILG	246
SpSec14p	RQASSISQDYPERMGKFVINAPWGFSSAFNLIKGFLEATVKKIHLG	239
 * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .	
CaSec14p	YSYKKELLKQIPQNLVVKFGGMSDVSD--DLLLLKDVGPWRDPEFIGPE	292
ScSec14p	SSYQKELLKQIPAENLPVKFGGKSEVDES KGGLYLSDIGPWRDPKYIGPE	294
CgSec14p	SSYQSELLKQIPAENLPKFGGKSEVDEAAGGLYLSDIGPWRDAKYIGPE	292
KlSec14p	SSYQKDLLKQIPAENLPKKGFGGQSEVSEAEGGLYLSDIGPWREEYIGPE	292
YKJ1p	SSYKKELLKQIPIENLPVKYGGT SVLHNPNDKFYYSIDIGPWRDPRIYIGPE	296
SpSec14p	SNYKSALLEQIPADNLPKLGNCQ---CPGGCELS DAGPWHEEQWMN--	284
	. * . . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .	
CaSec14p	GECPRAYNI-----	301
ScSec14p	GEAPEAFSM----K	304
CgSec14p	GEAPEMFSM----K	302
KlSec14p	GEAPKAFQI-----	301
YKJ1p	GEIPNIFGKFTVTS	310
SpSec14p	-----KN	286

Figura 16. Alineamiento de proteínas Sec14p de distintas levaduras y proteínas relacionadas. Ca: *C. albicans*, Sc: *S. cerevisiae*, Cg: *C. glabrata*, Kl: *K. Lactis*, YKJ1p: hipotética proteína codificada por el ORF YKL091c de *S. cerevisiae* y Sp: *S. pombe*. Los aminoácidos idénticos están marcados con un asterisco y los similares con un punto. En negrita se ha señalado la glicina 266 de la proteína de ScSec14p, cuyo cambio por ácido aspártico produce una proteína termosensible en este microorganismo.

2.5.2. Características de la secuencia de aminoácidos.

CaSEC14 codifica una proteína de 301 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 34,7 kDa, que comparte un elevado grado de homología con todas las proteínas Sec14p de otras levaduras descritas hasta la fecha (figuras 16 y 17). Así, comparte una identidad de 67,8 % con Sec14p de *S. cerevisiae*, de 67,7 % con la proteína de *K. lactis*, de 66,8 % con la misma proteína de *Candida glabrata* y de 62,7 % con los 300 residuos del extremo amino-terminal de Sec14p de *Y. lipolytica* (esta proteína presenta, además de la zona homóloga al resto de las proteínas Sec14p, 197 residuos en el extremo carboxi-terminal sin homología ni función descritas (Lopez *et al.*, 1994)). CaSec14p también presenta una elevada homología (59,8 %) con una proteína hipotética, YKJ1p, codificada por el marco abierto de lectura YKL091c de *S. cerevisiae*, cuya función no es conocida en la actualidad, y con Sec14p de *Schizosaccharomyces pombe* (54,9 %). La dos proteínas humanas más semejantes a CaSec14p son la proteína de transferencia de α -tocoferol y la de unión a retinaldehído, con porcentajes de identidad muy bajos en ambos casos (8 % y 6 % respectivamente). Todos estos porcentajes de identidad han sido obtenidos mediante el programa BLITZ, que para realizar los porcentajes tiene en cuenta la homología a lo largo de toda la proteína.

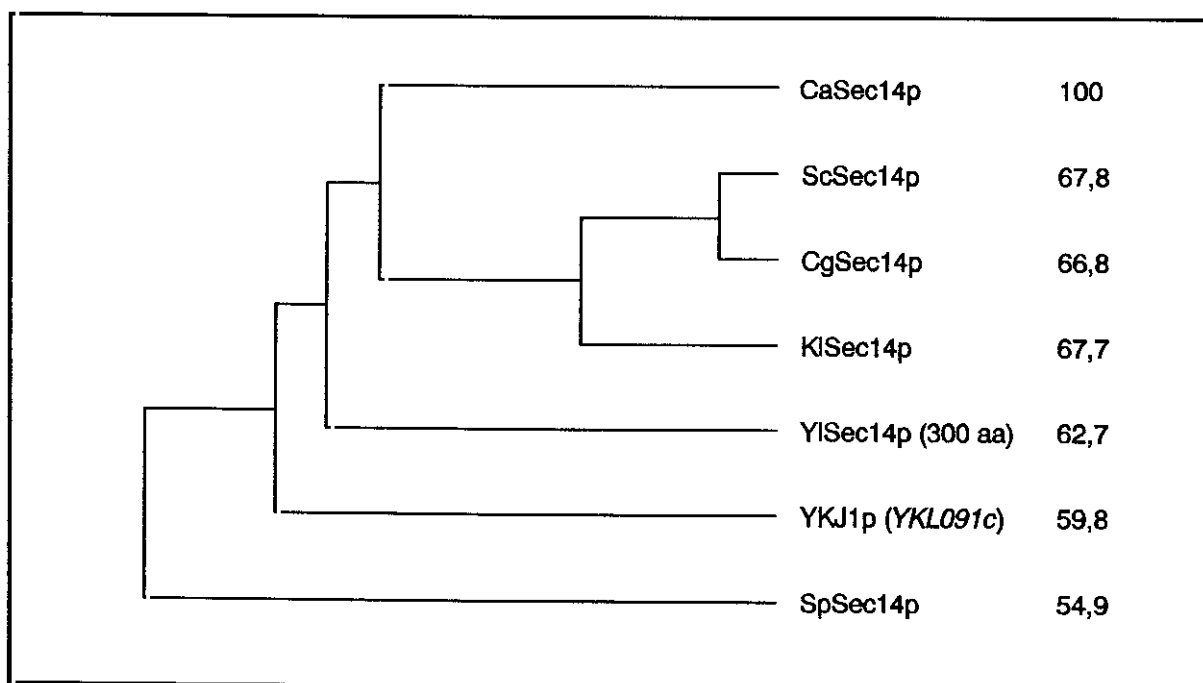


Figura 17. Dendrograma del alineamiento de proteínas Sec14p de distintos organismos y de proteínas relacionadas. Los números representan el porcentaje de homología entre CaSec14p y cada una de las otras proteínas. Ca: *C. albicans*, Sc: *S. cerevisiae*, Cg: *C. glabrata*, Kl: *K. Lactis*, Yl: *Y. lipolytica* (300 residuos del extremo amino-terminal), YKJ1p: hipotética proteína codificada por el ORF YKL091c de *S. cerevisiae* y Sp: *S. pombe*.

Muy recientemente se ha secuenciado un gen humano, al que se ha denominado SEC14L porque comparte cierta homología con SEC14 de *S. cerevisiae* (Chinen *et al.*, 1996). La proteína codificada por este gen es mucho mayor (715 aa) que las proteínas Sec14p de las

distintas especies de levadura y el porcentaje de homología compartido con *CaSEC14* (obtenido con el BLITZ) es muy bajo (6 %). Una zona de la proteína codificada por *SEC14L* comparte una homología algo mayor tanto con Sec14p de *S. cerevisiae* (29,3 % en 256 aminoácidos) como con la proteína de unión a retinal de calamar (29,4 % en 269 aa) (Chinen *et al.*, 1996). Esta última proteína une ligandos hidrofóbicos y su función es el transporte intracelular de retinoide en células fotorreceptoras (Chinen *et al.*, 1996). Al comparar la zona de 222 aa de Sec14Lp con mayor parecido a las proteínas Sec14p (desde el aa número 247 al aa número 469) con las bases de datos, se han obtenido, entre otros, los siguientes porcentajes de homología: 61,7 % con una hipotética proteína de *Caenorhabditis elegans* (ORF YNO2), 24 % con la proteína de unión a retinal de calamar, 20,5 % con Sec14p de *S. cerevisiae* y 18,9 % con Sec14p de *C. albicans*.

Con respecto al código genético utilizado en la traducción del *CaSEC14* a proteína, hay que destacar que el codón CTG que codifica el aminoácido 180 se traduciría por leucina, según el código genético universal, pero que en *C. albicans* (Leuker y Ernst, 1994; White *et al.*, 1995) y *C. cylindracea* (Kawaguchi *et al.*, 1989; Yokogawa *et al.*, 1992) se traduce por serina (ver figura 15). Esto podría suponer un problema si se necesitara expresar esta proteína en organismos heterólogos.

El perfil hidrofóbico de *CaSec14p* no muestra secuencia señal de entrada en la ruta de secreción, ni dominios transmembrana, lo que apunta a una localización posiblemente citosólica como en el caso de la proteína de *S. cerevisiae* en que se trata de una proteína citosólica con una fracción asociada a membranas del aparato de Golgi (Cleves *et al.*, 1991).

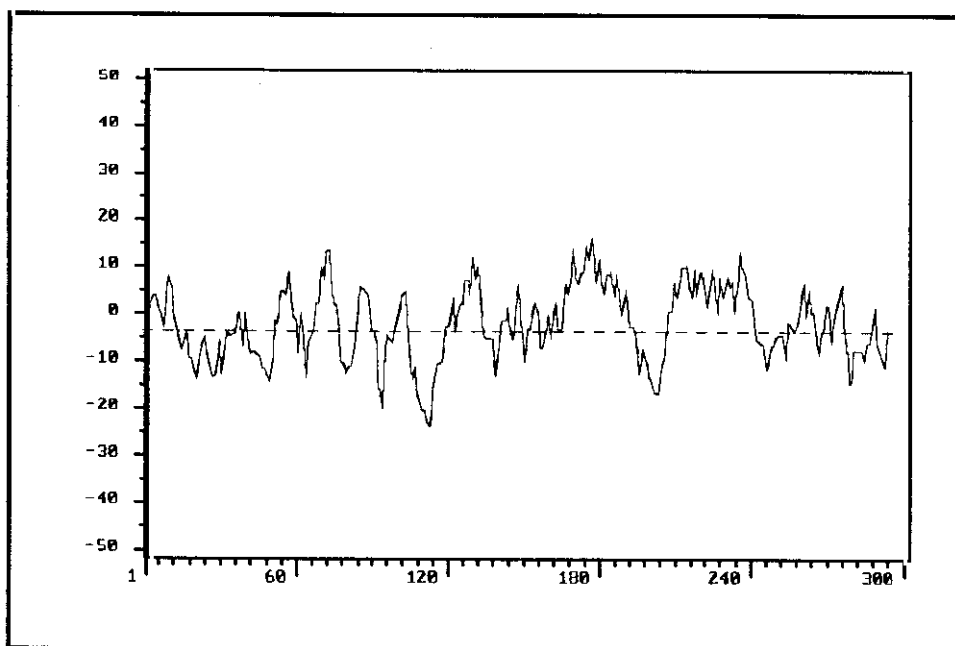


Figura 18. Perfil hidrofóbico de *CaSec14p*. Obtenido mediante el programa informático SOAP del programa de análisis de secuencias de DNA y proteínas PCGENE. En ordenadas se representa el índice hidrofóbico de cada uno de los aminoácidos señalados en abscisas.

2.6. Dispensabilidad del extremo carboxiterminal.

El inserto *EcoRI-EcoRI* del plásmido pLY1 (que es el mismo inserto que el de pLU1; tabla VII y figura 12) fue elegido para realizar sobre él las delecciones seriadas para la secuenciación de *CaSEC14*. Esto se debió a que pLY1 era el plásmido que portaba el inserto de menor tamaño capaz de complementar el defecto de crecimiento a 37 °C de *S. cerevisiae* CTY1-1A. Una vez secuenciado el gen, se pudo observar que el punto de corte de la enzima de restricción *EcoRI* se encontraba dentro del ORF de *CaSEC14* (ver figuras 12 y 15). Esto implica que la proteína codificada por pLY1 carece de los 13 aminoácidos del extremo carboxiterminal de *CaSec14p* y, aún así, en un plásmido multicopia complementa el defecto de crecimiento del mutante termosensible. Estos datos indican que el extremo carboxiterminal de la proteína es dispensable para su función, al menos en las condiciones ensayadas.

2.7. *CaSEC14* en multicopia puede sustituir a la función de *SEC14* en *S. cerevisiae*.

Para obtener más información sobre la homología funcional existente entre las proteínas codificadas por los genes *SEC14* de *C. albicans* y *S. cerevisiae* se comprobó si *CaSEC14* era capaz de sustituir la función del gen homólogo en *S. cerevisiae*.

Se realizó un experimento de intercambio de plásmidos en la estirpe de *S. cerevisiae* CTY588 (*MATa ade2 ade3 leu2 Δhis3 ura3-52 sec14Δ1::HIS3/pCTY11*). El plásmido pCTY11, que porta dicha cepa, está formado por un vector episómico de *S. cerevisiae* y los genes *LEU2*, *ADE3* y *SEC14* de esta misma especie.

S. cerevisiae CTY588 se transformó con pLM1 (tabla VII) para comprobar si podía sustituir a pCTY11. Un transformante con fenotipo Ura⁺ y que, por tanto, llevaba ambos plásmidos (SSC01, tabla V), fue utilizado para forzar la expulsión del plásmido pCTY11 (ver materiales y métodos, punto 7). Se obtuvieron colonias Leu⁻ de las cuales, posteriormente, se extrajo el plásmido que portaban y se ratificó que se trataba de pLM1. La estirpe obtenida, en la cual se había intercambiado pCTY11 por pLM1, se denominó SSC11 (tabla V).

El hecho de que haya sido posible obtener la cepa SSC11 es una prueba concluyente de que *CaSEC14* en multicopia es capaz de sustituir la función del gen *SEC14* de *S. cerevisiae*, ya que la copia cromosómica de dicho gen se encuentra delecionada en dicha cepa y su función es esencial para la viabilidad de la levadura.

2.8. Localización cromosómica del gen *CaSEC14*.

Se estudió en qué cromosoma de *C. albicans* estaba localizado el gen *CaSEC14*. Para ello, los cromosomas de distintas cepas fueron separados mediante electroforesis de campo pulsante tipo CHEF y transferidos a una membrana que posteriormente se hibridó con una sonda de dicho gen. Las cepas utilizadas fueron *C. albicans* 1001, 1006, y WO-1, debido a que existían mapas físicos de su organización cromosómica (Chu *et al.*, 1993; Navarro-García *et al.*, 1995a).

CaSEC14 hibrida con el cromosoma 5 de *C. albicans* 1006 (no mostrado) y de *C. albicans* 1001, así como con los cromosomas 2 y 4 de *C. albicans* WO-1 (figura 19). Esta última cepa tiene ciertas reorganizaciones cromosómicas con respecto a *C. albicans* 1006 y, según el mapa de Chu y colaboradores (Chu *et al.*, 1993; Navarro-García *et al.*, 1995a), el fragmento del cromosoma 5 de la cepa 1006 que se encuentra en los cromosomas 2 y 4 de la cepa WO-1 se denomina 5M. Se puede concluir que *CaSEC14* se encuentra localizado en el fragmento cromosómico 5M de las cepas *C. albicans* 1006 y *C. albicans* 1001, y en los cromosomas 2 y 4 de *C. albicans* WO-1.

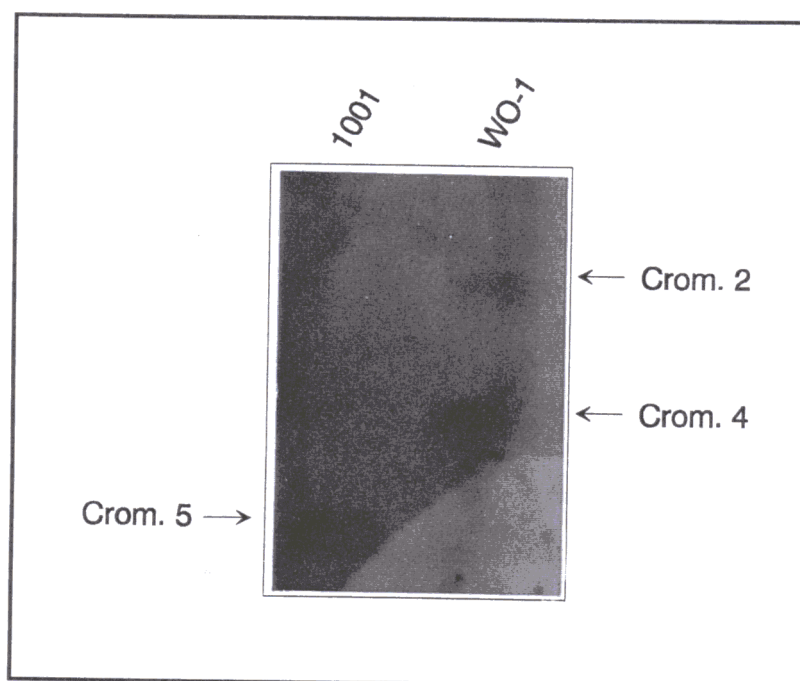
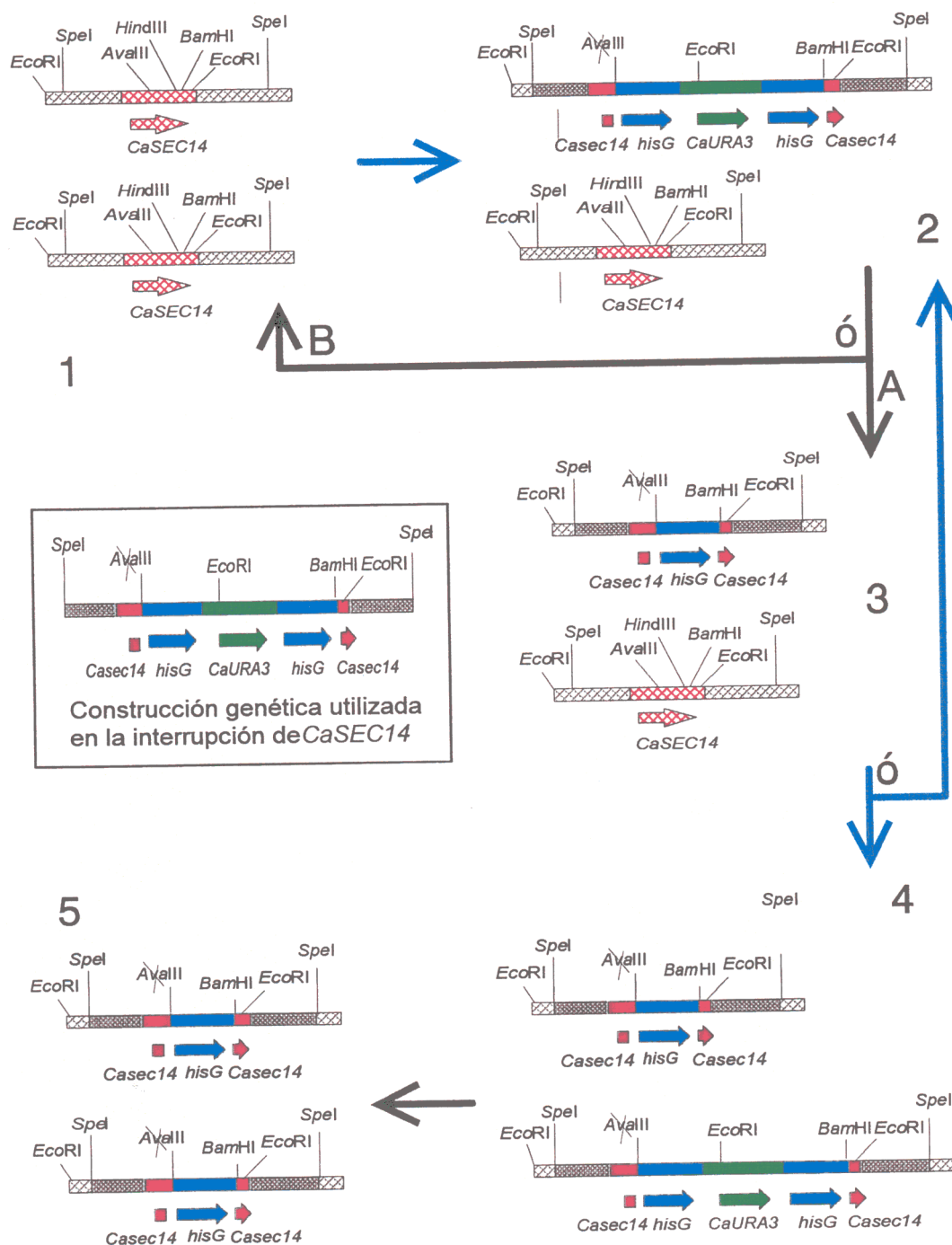


Figura 19. Localización cromosómica de *CaSEC14*. La sonda utilizada es un fragmento *EcoRI-EcoRI* de 2,1 kb que comprende casi todo el gen *CaSEC14* y la zona del genoma adyacente a éste en 5' (es el mismo fragmento que el inserto del plásmido pLY1, ver figura 12). Las flechas señalan la altura a la que se han detectado los distintos cromosomas en *C. albicans* 1001 (cromosoma 5) y en *C. albicans* WO-1 (cromosomas 2 y 4).

2.9. Deleción del gen *CaSEC14* en *C. albicans*.

Para profundizar en el estudio de la función de *CaSEC14* en *C. albicans* se planteó realizar la interrupción del gen para, posteriormente, analizar los efectos fenotípicos que su carencia produjera en este microorganismo. El desarrollo de un sistema de interrupción génica en *C. albicans*, por los doctores Fonzi e Irwin (Fonzi y Irwin, 1993), ha supuesto un gran avance que permite abordar el estudio funcional del elevado número de genes de esta especie que están siendo clonados.



- ➡ Transformación con la construcción de interrupción
- ➡ Expulsión del marcador *CaURA3* y selección con 5-FOA
- ▨ Zonas cuadriculadas: DNA genómico
- ▬ Zonas coloreadas: DNA de origen plasmídico
- ▬ *CaSEC14* ▬ *CaURA3* ▬ *hisG*
- ▨ DNA adyacente a *CaSEC14* en el genoma de *C. albicans*

Figura 20 (página anterior). Estrategia de interrupción que teóricamente valdría para ambos alelos del locus *CaSEC14*. Las distintas situaciones numeradas representan el locus *CaSEC14* de cada una de las cepas que se irían construyendo al ir realizando los distintos pasos de transformación o de expulsión del marcador necesarios para la interrupción de ambos alelos del gen. Situación 1: cepa CAI4; situación 2: CNC20; situación 3: CNC21; situación 4: cepa teórica Ura⁺ y con ambos alelos interrumpidos; situación 5: cepa teórica Ura⁻ y con ambos alelos interrumpidos. Las flechas negras señaladas con A y B indican la recombinación intracromosómica o intercromosómica, respectivamente. La diana de corte de la enzima *Avalll* que está presente en *CaSEC14* se utilizó para realizar la construcción genética utilizada en interrupción de dicho gen. Al realizar dicha construcción, esta diana de corte se eliminó, por lo que aparece tachada en la figura.

El mencionado método de interrupción consiste en el uso de una construcción genética formada por el marco abierto de lectura del gen de interés, en el que se han introducido dos copias del gen *hisG* de *Salmonella typhimurium* a ambos lados del marcador de selección (*CaURA3*) (figura 20). En una primera transformación de la cepa CAI4 (Ura⁻) con dicha construcción de interrupción, un alelo del gen de interés es sustituido por ésta. De entre los transformantes se seleccionan aquellos en que la integración se haya producido en el lugar esperado. En uno de éstos se fuerza la expulsión del marcador *CaURA3* mediante su incubación en un medio carente de presión selectiva, es decir con uracilo, y en 5-FOA (antimetabolito que sólo permite crecer a las estirpes Ura⁻), se seleccionan aquellos clones en los que haya producido dicha expulsión. Ésta puede producirse mediante dos tipos de recombinación diferentes:

A) Recombinación intracromosómica: recombinación entre las dos copias del gen *hisG* situadas a ambos lados del marcador de interrupción. Se elimina una copia del gen *hisG* y el gen *CaURA3* y queda uno de los alelos del gen interrumpido con *hisG*.

B) Recombinación intercromosómica: recombinación de las zonas flanqueantes a *hisG-CaURA3-hisG* con las zonas homólogas del alelo silvestre. Se recupera el genotipo parental.

De las cepas Ura⁻ obtenidas, se seleccionan aquellas en las se haya producido recombinación intracromosómica. Una de estas estirpes, se vuelve a transformar con la misma construcción de interrupción que en el primer paso. Entre los transformantes, hay que elegir aquellos en que ambos alelos del gen se encuentren interrumpidos, ya que es posible que en esta segunda transformación se vuelva a producir la recombinación en el alelo previamente interrumpido. En los clones elegidos, se puede volver a forzar la expulsión del gen *CaURA3* y recuperar, en 5-FOA, el fenotipo Ura⁻.

Para la interrupción del gen *CaSEC14* se construyó el plásmido pLIS4 (tabla VII). En dicha construcción parte del ORF de *CaSEC14* (fragmento *Avalll-BamHI*) fue reemplazada por la construcción *hisG-CaURA3-hisG*, manteniéndose a ambos lados de ésta una zona homóloga al DNA genómico del locus *CaSEC14* mayor a 1 kb. Esta zona es necesaria para permitir una buena recombinación homóloga con el DNA genómico de la cepa que se transforma. pLIS4 cortado con la enzima de restricción *SpeI* (para generar extremos homólogos al DNA genómico que permitieran la recombinación con éste en el lugar adecuado) fue el DNA utilizado para transformar la cepa CAI4.

2.9.1. Interrupción de un alelo del gen.

C.albicans CAI4 se transformó integrativamente con la construcción que procedía de la digestión del plásmido pLIS4 con la enzima de restricción *SpeI* (representada en la figura 20). De los transformantes URA⁺, ocho fueron analizados por PCR con los oligonucleótidos Isec1 (secuencia homóloga al DNA genómico cercano a donde se debería producir la integración y exterior a el) y Ohg1 (situado en *hisG*) (figura 21 y tabla VIII). De estos clones, seis amplificaron una banda de 1,6 kb que no aparecía en la cepa CAI4 y que era del tamaño esperado si el proceso de integración se había producido en el sitio correcto. Por tanto, en estos transformantes un alelo de *CaSEC14* se encontraba interrumpido con *hisG-CaURA3-hisG*. De este resultado se puede concluir que el proceso de delección del primer alelo se ha producido con una frecuencia de un 75 %. De los clones deleccionados, se eligió el número 11, al que se le denominó CNC20 (situación 2 en figura 20), para continuar el proceso de interrupción.

Seguidamente, se forzó la expulsión del gen *CaURA3* en la estirpe CNC20. Para esto, CNC20 fue incubado durante muchas generaciones en un medio rico, con doble concentración de uracilo que permitiera recombinaciones en las que se perdiera el gen *CaURA3* y, posteriormente, las células se sembraron en placas de 5-FOA donde se seleccionaron las colonias con fenotipo Ura⁻. De ellas, nos interesaban aquellas que habían sufrido una recombinación intracromosómica y, por consiguiente, un alelo de *CaSEC14* se encontraba interrumpido por *hisG*. Se analizaron 10 clones por PCR, con los mismos oligonucleótidos que en el caso anterior y, de éstos, sólo uno, que se denominó CNC21, seguía amplificando la banda de 1,6 kb, mientras que en los otros se había producido una recombinación intercromosómica que regeneraraba el genotipo de CAI4. CNC21 (situación 3 en la figura 20 y figura 21A) se utilizó como cepa Ura⁻ para continuar con el proceso de interrupción.

Posteriormente, se ratificó mediante hibridación DNA-DNA que CNC20 y CNC21 portaban un alelo de *CaSEC14* interrumpido (figura 21B).

2.9.2. Transformación para la delección del segundo alelo de CaSEC14.

Con el objeto de obtener un mutante de *C.albicans* homocigótico en el *locus CaSEC14*, *C.albicans* CNC21 se transformó integrativamente con pLIS4 cortado con *SpeI* (el mismo DNA que el utilizado en la interrupción del primer alelo del gen). De los transformantes obtenidos, sesenta fueron analizados mediante hibridación DNA-DNA con la misma sonda que en los experimentos anteriores. Aunque el patrón de bandas varía en alguno de los transformantes, en ninguno de ellos desaparece la banda del alelo silvestre de *CaSEC14*. De esto se deduce que no se ha logrado obtener un mutante de *Candida albicans* con ambos alelos del gen interrumpidos. La imposibilidad de obtener este mutante sugiere que, al igual que en *S. cerevisiae*, *CaSEC14* podría ser un gen esencial para el crecimiento de la levadura. Si este es el caso, *CaSEC14* cumpliría una de las características primordiales para su utilización como diana en el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos.

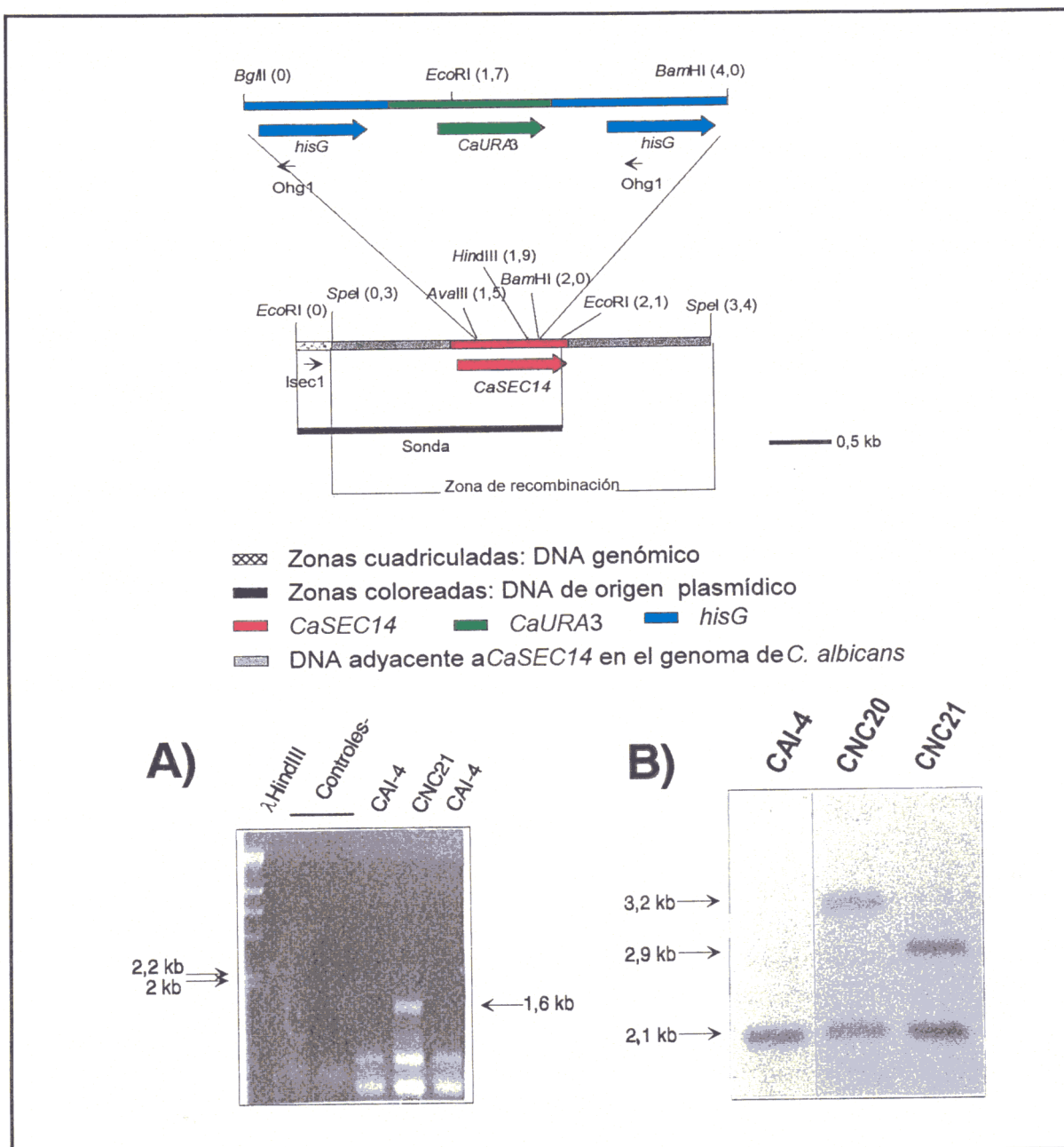


Figura 21. Esquema de interrupción de *CaSEC14* y análisis de las cepas con un alelo interrumpido mediante: A) PCR y B) Southern blot. A) PCRs en las que se amplificaron los DNAs genómicos extraídos de las cepas indicadas (situaciones 1 y 2 de la figura 20). Los oligonucleótidos utilizados fueron *Isec1* y *Ohg1* y las condiciones de la amplificación fueron: 1º: dos ciclos a 94° C/3'; 40° C/1'30"; 72° C/2'; 2º: veintiocho ciclos a: 92° C/2'; 49° C/1'30"; 72° C/2' y 3º: un ciclo a 92° C/2'; 49° C/1'30"; 72° C/10'. B) Southern blot: Los DNAs genómicos se cortaron con *Eco*RI y la sonda de 2,1 kb *Eco*RI-*Eco*RI corresponde con el inserto de pLU1 o pLY1. La banda de 2,1 kb corresponde al locus silvestre de *CaSEC14*, la de 3,2 kb con el locus de *CaSEC14* interrumpido por *hisG-URA3-hisG* y la de 2,9 kb, con el mismo locus interrumpido por *hisG* únicamente.

Mediante un análisis más riguroso de los resultados del análisis por Southern blot de los transformantes obtenidos en la transformación para la delección del segundo alelo de *CaSEC14*, se pueden observar distintos patrones de bandas (figura 22):

-En la mayoría de los transformantes, treinta y ocho clones (por ejemplo, clones 3 y 4), aparece una banda correspondiente al gen silvestre (2,1 kb) y otra al gen interrumpido con la construcción *hisG-CaURA3-hisG* (3,2 kb), como en el caso de la cepa CNC20. Este resultado indica que el proceso de recombinación ha tenido lugar en el alelo que había sido previamente interrumpido.

-En otros ocho clones (por ejemplo, en el clon 5), además de las dos bandas de la cepa CNC20 (2,1 kb y 3,2 kb) también se detectan bandas adicionales de tamaño inesperado. Esto indica la integración de la construcción de interrupción tanto en el alelo previamente interrumpido de *CaSEC14* como en otros *loci* del genoma de *C. albicans*.

-Otro patrón que se pudo detectar en ocho de los transformantes analizados (por ejemplo, en los clones 2 y 9) corresponde a la integración inespecífica del DNA transformante en el genoma de CNC21, por lo cual, además de las bandas que se obtendrían si se tratara de esta cepa (2,1 kb y 2,9 kb), se pueden observar otras bandas cuyo tamaño es, en todos los casos, mayor al de las bandas esperadas.

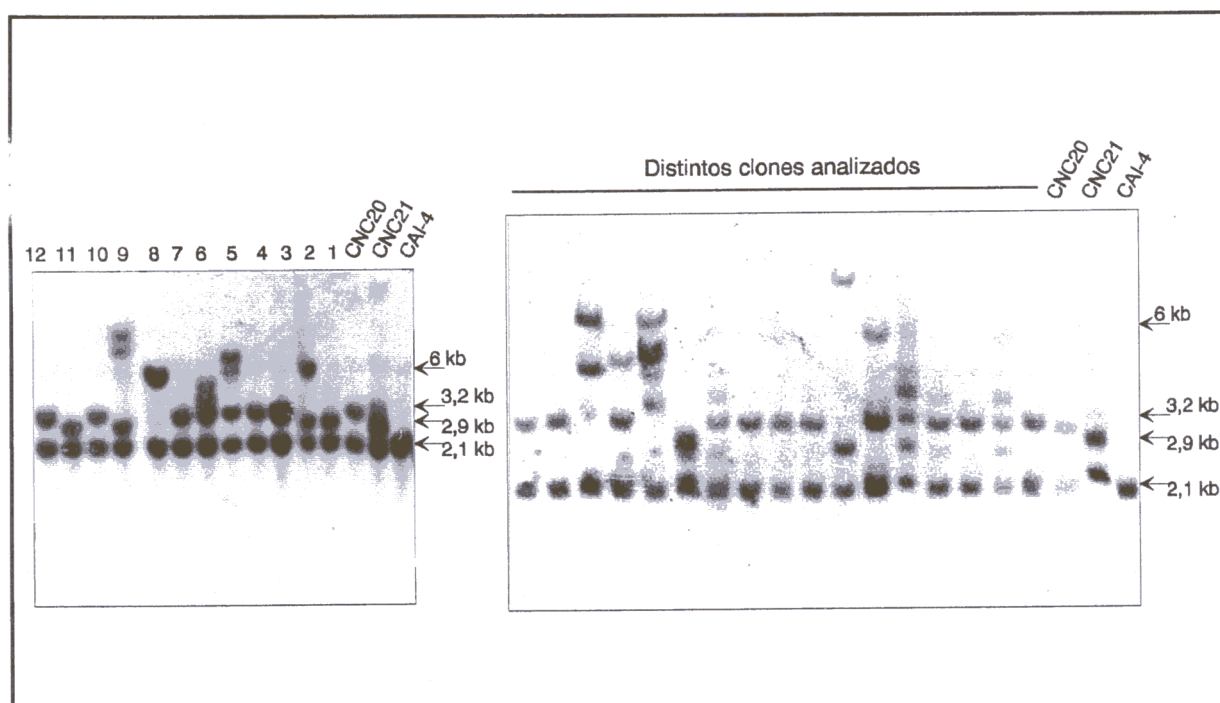


Figura 22. Análisis mediante Southern blot de algunos de los transformantes obtenidos en la transformación para la interrupción del segundo alelo de *CaSEC14*. Los DNAs genómicos han sido digeridos con *EcoRI* y la sonda utilizada es la misma que en el experimento de hibridación para la comprobación de la interrupción del primer alelo de *CaSEC14* (figura 21). A algunos de los transformantes numerados se hace referencia en el texto por tener un patrón de bandas representativo. En los carriles no numerados aparecen otros transformantes analizados. A la altura de 6 kb se indica la otra banda de hibridación con *CaSEC14* (distinta a la que corresponde al propio *CaSEC14*) del genoma de *C. albicans* (resultados, punto 2.3 y figura 14).

-En el resto de los transformantes, la explicación de los patrones de bandas que aparecen es más compleja. Así, en 5 de ellos (por ejemplo, en el clon 8), se comprueba que la recombinación tuvo lugar en el alelo ya interrumpido al desaparecer la banda de 2,9 kb que procedía de éste, pero, en su lugar, aparecen bandas de tamaño mayor al esperado si se tratara de una simple recombinación homóloga. En el clon número 11 se detecta el mismo patrón de bandas que en la cepa CNC21 que, al contrario que los transformantes, presenta un fenotipo Ura-.

Es de destacar que en muchos de los transformantes en los que se detectaron bandas mayores a las esperadas, esas bandas son de 6 kb, es decir, presentan a la altura del *locus* homólogo a *CaSEC14* que aparece en todos los clones analizados (resultados, punto 2.3 y figura 14). Es coherente suponer que la integración se produzca más frecuentemente en zonas del genoma con un determinado grado de homología en la secuencia, que en cualquier lugar aleatorio del DNA genómico de *C. albicans*.

También es posible que en algunos de los transformantes se hayan producido fenómenos de multimerización de la construcción de interrupción, de forma que se hayan integrado varias copias de la misma que se detecten como bandas mayores al tamaño esperado. Este fenómeno se ha descrito en el proceso de interrupción del gen *CHS2* de *C. albicans* (Gow *et al.*, 1993), en el cual, finalmente, se obtuvieron los alelos mutantes esperados (Gow *et al.*, 1994).

2.9.3. Análisis fenotípico de las cepas de *C. albicans* con un alelo de *CaSEC14* delecionado.

Debido a la imposibilidad de obtener el doble mutante *Casec14Δ/Casec14Δ*, se llevó a cabo un estudio fenotípico preliminar para determinar si la carencia de un alelo del gen producía algún tipo de modificación en los procesos vitales de *C. albicans*. Los ensayos fueron realizados tanto con las cepas protótrofas (SC5314 y CNC20) como con las auxótrofas para uracilo (CA14 y CNC21). De esta manera, si se observara algún fenotipo, se podría discernir si se debía a la mutación en *CaSEC14* o a un fondo genético determinado.

Filamentación:

En primer lugar, se comprobó la capacidad de filamentación de las distintas cepas en suero de caballo. Se tomaron muestras a las 3, 6 y 18 horas después de la inoculación y no se observaron diferencias significativas entre las cepas interrumpidas y las correspondientes cepas parentales. Este mismo ensayo se realizó en medio de Lee. Las muestras se tomaron a las 3, 9 y 24h y se observó que en las cepas con fenotipo Ura- (CA14 y CNC21) la filamentación era algo más lenta que en las correspondientes Ura+ (SC5314 y CNC20). La comparación entre *C. albicans* SC5314 y *C. albicans* CNC20 no mostraba cambios significativos en el patrón de filamentación.

Secreción de exoglucanasa:

Como medida del estado de la ruta secretora se ensayaron las actividades de dos enzimas secretadas al medio de cultivo a través de ella: la exoglucanasa y la fosfatasa ácida. Ambos ensayos fueron realizados en placa y en ninguno de los casos se detectaron diferencias entre las cepas parentales y los correspondientes mutantes heterozigóticos.

Análisis caritípico:

Para comprobar si la interrupción de un alelo del gen *CaSEC14* había producido alguna reorganización cromosómica, los cromosomas de las cepas SC5314, CAI4, CNC20 y CNC21 fueron separados mediante electroforesis de campo pulsante (CHEF). Se comprobó que los mutantes con un alelo de *CaSEC14* interrumpido presentan el mismo patrón de bandas que la cepa SC5314 de la que provienen (figura 23).

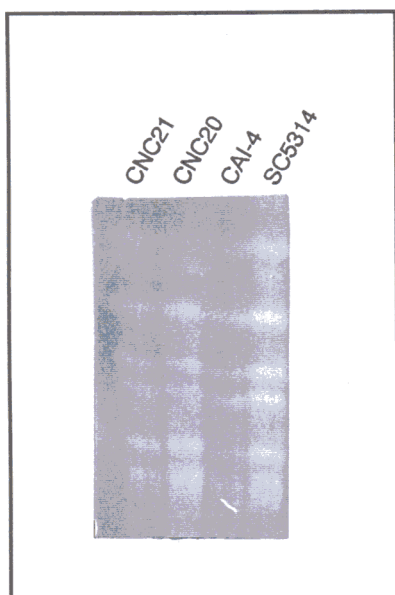


Figura 23. Análisis cariotípico de las cepas de *C. albicans* con un alelo de *CaSEC14* interrumpido. SC5314 (cepa parental, Ura+); CAI4 (cepa parental, Ura-); CNC20 (*Casec14*Δ, Ura+); CNC21 (*Casec14*Δ, Ura-). Las condiciones del CHEF se comentan en los materiales y métodos, punto 5.8)

2.10. Construcción de un mutante de *C. albicans* *sec14^{ts}*.

El estudio de la función de *SEC14* en *C. albicans* y de sus posibles implicaciones en los procesos de secreción de proteínas o de filamentación, se encontró dificultado por la imposibilidad de obtener un mutante de delección homocigótico. Este problema se abordó, como en el caso de genes esenciales de otros organismos, tratando de construir un mutante condicional, en nuestro caso termosensible. Debido a la inexistencia de mutantes termosensibles de *C. albicans* obtenidos por mutagénesis dirigida, en los que se conociera el cambio producido en la proteína para convertirla en termosensible, se trató de introducir en la proteína de *Candida* la misma mutación que había sido descrita en la proteína Sec14p termosensible de *S. cerevisiae*.

La estrategia elegida fue el reemplazamiento del alelo silvestre de *CaSEC14* en *CNC21* por el gen mutado mediante un proceso que se llevaría a cabo en dos pasos secuenciales. En un primer paso de transformación, se introduciría dentro de *CNC21* un plásmido con el gen mutado y el marcador de interrupción *CaURA3*, cortado dentro del ORF de *CaSEC14*. De esta manera, si la integración se produjera en el alelo adecuado quedaría, en uno de los cromosomas, una construcción con dos copias del gen (una de ellas mutadas) y entre éstas el marcador de interrupción. Tras esto, se forzaría la expulsión del marcador creciendo la cepa en medio rico con uridina en exceso y los clones con fenotipo Ura⁻ se seleccionarían en medio con 5-FOA (este proceso está esquematizado en la figura 28). De estos clones Ura⁻ se podría elegir aquellos que presentaran defectos de crecimiento a temperaturas elevadas y, posteriormente, se comprobaría si presentan el genotipo esperado.

2.10.1. Construcción de plásmidos con distintos alelos mutantes.

El alelo *sec14-1^{ts}* de *S. cerevisiae* presenta una mutación que produce el cambio en el aminoácido 266 de glicina (GGT) (señalado en la figura 16) a ácido aspártico (GAT) (Cleves *et al.*, 1989). Debido a que en la posición 266 de *CaSec14p* también se encuentra una glicina, se podría obtener el mismo cambio en la proteína de *C. albicans*. Para ello, se realizó una mutagénesis dirigida mediante el método de obtención de mutaciones puntuales por PCR descrito en el manual "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al.*, 1993). Se diseñaron dos oligonucleótidos, "oli3" y "olimut19" (ver tabla VIII y figura 24) que, emparejados con "M13UP" y "M13RP" (ver tabla VIII) respectivamente, y utilizando como molde pLU2, amplificarían dos bandas que al ser nuevamente clonadas en pUC19 formarían un plásmido igual a pLU2 pero con el cambio de G por A esperado (materiales y métodos, punto 5.10 y figura 26).

En primer lugar, se realizaron las 2 PCRs, utilizando como molde pLU2. En la primera amplificación (PCR1) se utilizaron como cebadores "M13UP" y "oli3", por lo que se obtuvo una banda de 2,1 kb. En la segunda (PCR2), en la cual se utilizaban como cebadores "M13RP" y "olimut19", se amplificó una banda de 151 bp, con la que, debido a su pequeño tamaño, hubo que trabajar con una serie de precauciones especiales. Ambos productos de PCR se trataron con Klenow, se digirieron con *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente, y fueron subclonados simultáneamente en pUC19, de manera que cada uno de ellos ligó con el otro y con el mencionado vector y se obtuvo un plásmido que se creía igual a pLU2, excepto en que se había introducido una mutación puntual (figura 26).

```

          GGGTGGAGTTTAAATGGTCTGTT      A
TGAACAAATCCCACCTCAAAATTTACCAGTCAAATTTGGTGGTATGTCAGATGTTTCTGAT
GACGATTTATTATTAAGATGTTGGTCCTGGAGAGATCCAGAATTCATTGGTCCAGAAGG
TGAATGTCCTAGAGCTTATAACATTTA

```

Figura 24. Hibridación de los oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis dirigida con la secuencia de *CaSEC14*. Secuencia de nucleótidos de *CaSEC14* a partir de la base 1100 de la secuencia depositada en la base de datos del EMBL y representada en la figura 15. En rojo, "oli3" (oligonucleótido en la hebra complementaria a *CaSEC14*) y en verde, "olimut19".

La secuenciación de un fragmento de estos plásmidos construidos como se acaba de describir, permitió observar que, además de haberse producido la transición esperada (G por A), también se habían eliminado 6 pares de bases adicionales en un plásmido secuenciado y 9 pares de bases en otro. El hecho de que la pérdida de bases se produjera en el extremo romo de una de las bandas de PCR, sugiere que pudo deberse a que en 5' del cebador se formara un pequeño lazo y no se sintetizara la banda en su totalidad, o a la existencia de algún problema con la enzima "Klenow". Los alelos de *CaSEC14* que portaban dichas mutaciones se denominaron *Casec14-1* y *Casec14-7* (figura 25) y a los plásmidos que las portaban pLU2M1 y pLU2M7 (tabla VII y figura 26).

En el alelo *Casec14-1*, además del cambio que habíamos tratado de introducir, se ha producido la pérdida de los aminoácidos 263 (V) y 264 (K) de *CaSec14p*; mientras que en *Casec14-7* se ha eliminado también el aminoácido 262 (P). En ninguno de los dos casos se produce el corrimiento del marco abierto de lectura que es codificado a lo largo de toda la proteína (figura 25).

<i>CaSEC14</i>	CACCTCAAAATTTACCAGTCAAATTTGGTGGTATGTCAGATGTTT
<i>Casec14-1</i>	CACCTCAAAATTTACC-----ATTTGGTGATATGTCAGATGTTT
<i>Casec14-7</i>	CACCTCAAAATTT-----ATTTGGTGATATGTCAGATGTTT

Figura 25. Secuencias de los alelos mutantes. Comparación de las secuencias nucleotídicas del fragmento en que se diferencian los plásmidos pLU2M1 (*Casec14-1*) y pLU2M7 (*Casec14-7*) del gen silvestre. Secuencia a partir de la base 1112 de la secuencia depositada en el EMBL y representada en la figura 15.

Debido al desconocimiento de mutaciones que den lugar a proteínas termosensibles de *C. albicans*, se optó por probar el fenotipo que las proteínas codificadas por los alelos mutantes *Casec14-1* y *Casec14-7* producían tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*. Para llevar a cabo este objetivo se construyeron los plásmidos pSLK7M1, pSLK7M7, YEM1 y YEM7 (tabla VII y figura 26).

El origen de los plásmidos pSLK7M1 y pSLK7M7 es el plásmido SKBluescript y contienen, además del gen *CaURA3* como marcador de selección para *C. albicans*, los alelos mutantes obtenidos. En su construcción se sustituyó la banda *Styl-BamHI* (148 pb) de pSLK6 por la misma de los plásmidos pLU2M1 y pLU2M7. Para comprobar el correcto reemplazamiento del alelo silvestre por el mutado, y debido a que la diferencia de tamaño era mínima, se realizó un gel de poliacrilamida que permitió detectar estas pequeñas diferencias de 6 y 9 pb en el tamaño de la banda (no mostrado). Posteriormente, también se realizó la secuenciación de la zona de interés de los plásmidos mutantes, ratificando que se habían introducido las mutaciones esperadas como se había comprobado mediante dicho gel de acrilamida.

2.10.2. Comprobación de la termosensibilidad de Casec14-1 y Casec14-7 en *S. cerevisiae*.

Con objeto de comprobar la funcionalidad a 30°C y 37°C de los alelos mutantes del gen *CaSEC14* obtenidos anteriormente, se construyeron los plásmidos YEM1 y YEM7 (figura 26).

La transformación del mutante termosensible de *S. cerevisiae* CTY1-1A con los plásmidos YEM1 y YEM7, así como con los correspondientes controles (se utilizó YEp352 como control negativo y pLM1 como control positivo de complementación), permitió comprobar que los alelos *Casec14-1* y *Casec14-7* no eran capaces de complementar el defecto de crecimiento del mutante termosensible a 37 °C.

Para estudiar si los alelos mutantes son funcionales a temperatura permisiva, YEM1 y YEM7 se transformaron en un diploide de *S. cerevisiae* heterocigótico para el *locus SEC14*: CTYD2 (*sec14-3/sec14Δ1::HIS3*, tabla VI). Los transformantes se sembraron en condiciones de esporulación y las ascas obtenidas tras la micromanipulación de las tétradas fueron analizadas. La poca capacidad presentada por la cepa diploide para esporular (siempre se obtenía un porcentaje de tétradas mucho menor del esperado) imposibilitó el análisis de un número elevado de tétradas pero, al menos en el caso del alelo *Casec14-1*, en todas las tétradas estudiadas se obtuvieron ascas con fenotipo His⁺. Este dato indica claramente la capacidad de complementación del plásmido introducido a 30°; ya que *HIS3* es el marcador de interrupción del gen *SEC14* en esta cepa y, debido a la esencialidad de este gen en *S. cerevisiae*, las ascas His⁺ sólo podrían sobrevivir gracias a la complementación plásmidica del defecto producido por su interrupción. Se comprobó así, que el alelo *Casec14-1* es funcional a la temperatura permisiva, a pesar de la pérdida de varios aminoácidos. También se constató que el carácter termosensible de la mutación se detecta en placa solamente cuando el número de células sembrado es muy limitado. Así, se sembraron gotas con 1.000, 10.000 y 100.000 células y se comprobó que la termosensibilidad a 37°C era claramente detectada en el caso de menor número de células. Esto ocurría tanto en las esporas con fenotipo His⁺ como His⁻, lo que indica que es una característica tanto del alelo mutante del gen de *C. albicans* como del de *S. cerevisiae*.

La escasa capacidad presentada por CTYD2 para esporular impidió, en el caso de *Casec14-7*, la obtención de un número suficiente de ascas que permitiera llegar a una conclusión clara sobre la funcionalidad de este alelo a la temperatura permisiva.

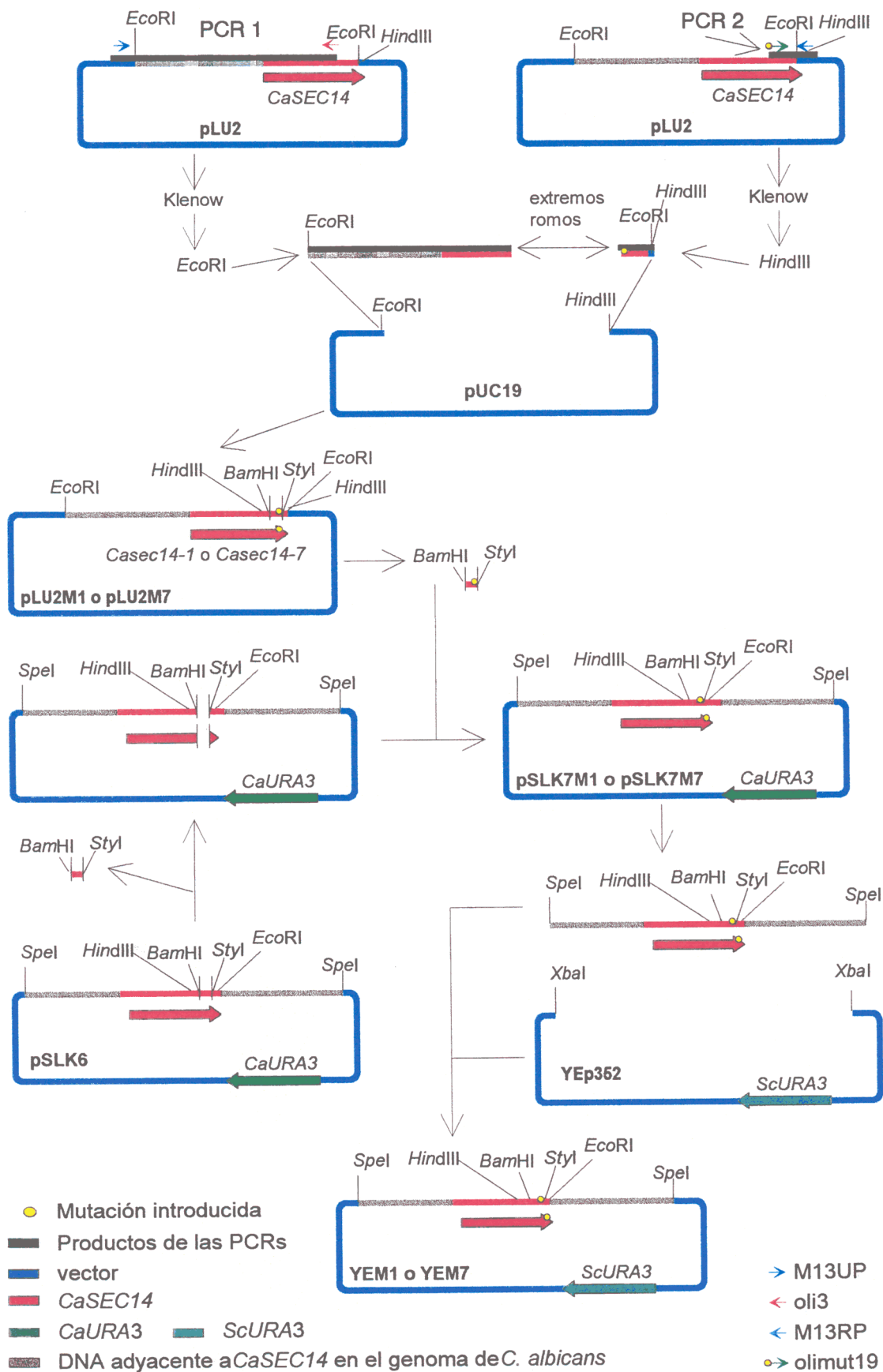


Figura 26 (página anterior). Construcción de los distintos plásmidos que portan los alelos mutantes de *CaSEC14*. Las condiciones de amplificación utilizadas en la PCR1 fueron: 1º: un ciclo a 97 °C/10'; 92 °C/2'; 52 °C/1'; 72 °C/3' 30"; 2º: ventiocho ciclos a: 92 °C/1'; 52 °C/1'30"; 72 °C/3' 30" y 3º: un ciclo a 92 °C/1'; 52 °C/1'30"; 72 °C/10' y en la PCR2 fueron las mismas, excepto en que la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos fue de 40 °C (en vez de 52 °C) y el tiempo de elongación fue de 45" (en vez de 3' 30"). Se realizó una ligación con ambas PCRs (tratadas convenientemente) y pUC19, con lo que se construyeron pLU2M1 o pLU2M7. El fragmento *Bam*HI-*S*tyI de pSLK6 fue sustituido por los mismos fragmentos pLU2M1 y pLU2M7, que portaban la mutación, construyéndose así pSLK7M1 o pSLK7M7. Mediante la subclonación de los fragmentos *Spe*I-*Spe*I de estos últimos plásmidos en YEpl352 se construyeron YEM1 y YEM7.

2.10.3. Introducción de los genes mutados en *C. albicans* CNC21 y expulsión del marcador.

Como herramienta para el estudio de los efectos producidos por la pérdida de la función del gen *SEC14* en *C. albicans*, se abordó la construcción de un mutante termosensible de *C. albicans* con mutaciones en *CaSEC14*. Con este objetivo, CNC21 se transformó con los plásmidos pSLK7M1 y pSLK7M7. Para forzar la integración de los plásmidos en el alelo silvestre de CNC21, su digestión se llevó a cabo con la enzima de restricción *Hind*III. El hecho de que las zonas de *CaSEC14* adyacentes a la diana de corte de esta enzima no estén presentes en el alelo deleciónado de esta cepa, hace suponer que con su utilización se favorezca la recombinación del DNA transformante en el alelo de interés. *C. albicans* CNC21 se transformó también con pSLK6, que contiene el gen silvestre como control del experimento.

Los transformantes en los que se hubiera producido la integración correcta, en este primer paso de transformación, portarían en uno de los alelos dos copias de *CaSEC14*, una silvestre y otra termosensible (figura 28, situación 2). Se seleccionaron para su posterior análisis diez transformantes de los obtenidos en cada transformación con cada plásmido. Estos transformantes Ura⁺ se denominaron:

- los procedentes de la transformación con pSLK6: CSC6-a, CSC6-b, CSC6-c, etc.,
- los de la transformación con pSLK7M1: CSM1-A, CSM1-B, CSM1-C, etc.,
- los de la transformación con pSLK7M7: CSM7-1, CSM7-2, CSM7-3, etc.

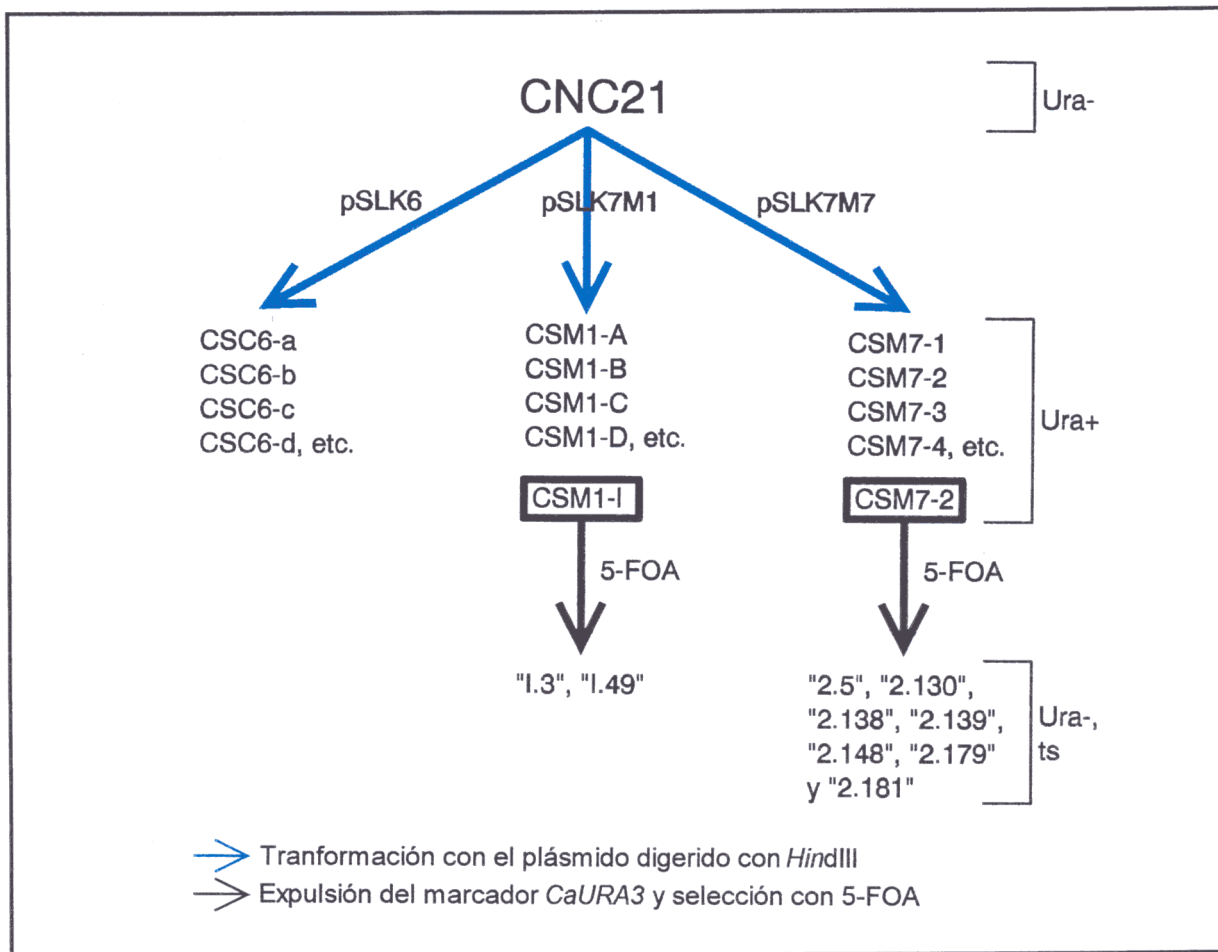
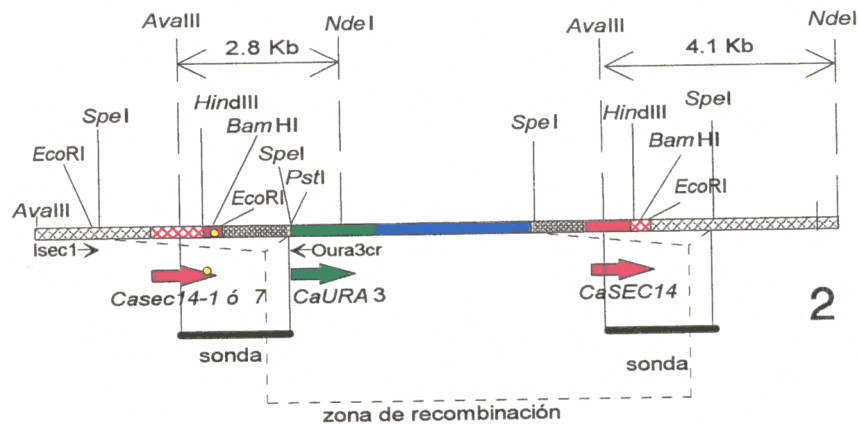
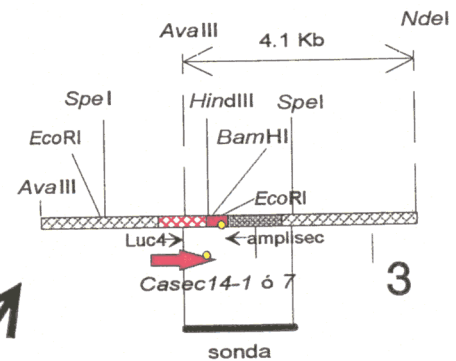
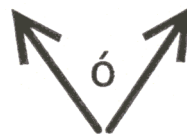
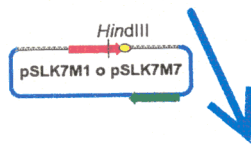
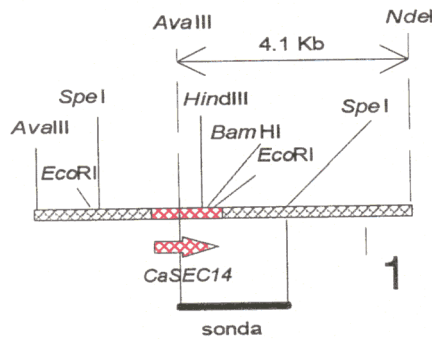
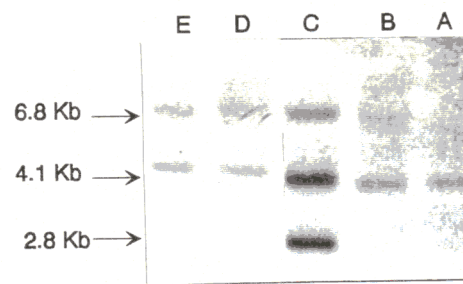
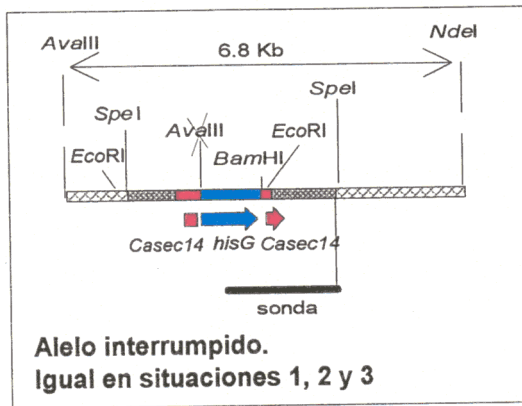


Figura 27. Distintas cepas obtenidas durante la construcción de un mutante de *C. albicans* termosensible.

Figura 28 (ver página siguiente). Estrategia para la construcción de un mutante de *C. albicans* termosensible en *CaSEC14* y análisis de las cepas obtenidas mediante Southern blot. Los DNAs genómicos se digirieron con las enzimas de restricción *AvaII* y *NdeI* y la sonda utilizada estaba formada por el fragmento *AvaII-PstI* del plásmido pSLK6 (comprende el mismo DNA que el fragmento *AvaII-SpeI* del locus *CaSEC14*). **Carril A:** CAI4 (ambos alelos parentales); **carril B:** CNC21 (situación 1); **carril C:** CSM7-2 (corresponde con la situación 2; el clon CSM1-I y muchos otros de los clones analizados presentan el mismo patrón de bandas); **carril D:** clon "1.3" (situación 1 ó 3); **carril E:** clon "2.179" (situación 1 ó 3). **Isec1** y **Ora3cr:** oligonucleótidos utilizados en las PCRs para detectar la correcta recombinación del DNA transformante. Amplifican una banda de 2,7 kb utilizando las siguientes condiciones 1º: un ciclo a 97° C/10'; 2º: dos ciclos a 92 °C/2'; 55° C/1'; 72 °C/4'; 3º: ventiocho ciclos a: 92 °C/1'; 55 °C/1'; 72 °C/4' y 4º: un ciclo a: 92 °C/1'; 55 °C/1'; 72 °C/10'. **Luc4** y **amplisec:** oligonucleótidos utilizados para la recuperación alélica y comprobación de la existencia o no de la mutación en el genoma (resultados, punto 2.10.4). Las condiciones utilizadas en esta amplificación son: 1º: un ciclo a 97° C/10'; 92 °C/2'; 51° C/1'; 72 °C/1' 30"; 2º: treinta ciclos a: 92 °C/1' 30"; 51 °C/1'; 72 °C/1' 30" y 3º: un ciclo a: 92 °C/1' 30"; 51 °C/1'; 72 °C/10'.



500 pb —

- ➡ Transformación con el plásmido digerido con *HindIII*
- ➡ Expulsión del marcador *CaURA3* y selección con 5-FOA
- Mutación introducida
- ▨ Zonas cuadrículadas: DNA genómico
- Zonas coloreadas: DNA de origen plasmídico
- *CaSEC14* ■ *CaURA3*
- *hisG* ■ vector (SK Bluescript)
- ▨ DNA adyacente a *CaSEC14* en el genoma de *C. albicans*

La elección de los transformantes en los que se había producido la integración en el lugar adecuado se realizó, en primer lugar, mediante PCR. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos Isec1 y Oura3cr (señalados en la situación 2 de la figura 28) que, en caso de que la integración hubiera sido la correcta, amplificaban una banda de 2,7 kb. Posteriormente, estos transformantes también se analizaron mediante Southern blot y de 18 transformantes analizados, se obtuvieron los siguientes resultados:

- En la mayoría de los clones (catorce) se ha producido la integración adecuada en el alelo esperado y presentan el mismo patrón de bandas que el del carril C de la figura 28.
- En dos de los clones (CSM1-B y CSM1-J) aparece un patrón de bandas similar al de CNC21 (carril B, figura 28). Este patrón corresponde a la integración de la construcción en alelo anteriormente interrumpido.
- En otros dos clones aparecen sólo las bandas de 2,8 kb y de 6,8 kb. La explicación de este patrón de bandas es más compleja ya que no se detecta la banda correspondiente al alelo parental: parece que la recombinación hubiera tenido lugar en el alelo parental pero de una manera inadecuada. El hecho de que mediante PCR se pudiera amplificar la banda esperada en transformantes en los que, parece que se hubiera producido la recombinación correcta solamente por uno de los extremos del DNA transformante, nos hizo descartar el uso de esta técnica en la posterior selección de los transformantes.

La mayoría de los transformantes analizados presenta el genotipo buscado. Esto corrobora que se haya dirigido la integración al alelo parental de CNC21 gracias a que se ha transformado con un DNA cuyos extremos únicamente tienen zonas homólogas en el alelo parental del genoma de esta cepa, ya que la zona cercana a *HindIII* (enzima con la que se ha digerido el DNA transformante) del *locus CaSEC14* ha sido deletada en el alelo interrumpido.

Los transformantes Ura⁺ CSM1-I y CSM7-2, en los que se había observado una integración correcta por Southern blot (CSM7-2: carril C, figura 28) fueron seleccionados para obtener a partir de ellos estirpes Ura⁻ con un fenotipo termosensible que pudiera deberse a la mutación introducida. CSM1-I y CSM7-2 fueron incubados en condiciones propicias para la recombinación y pérdida del marcador y, posteriormente, las colonias Ura⁻ fueron seleccionadas con 5-FOA. Se analizó la capacidad de crecimiento a 30 °C, 37 °C y 42 °C de 150 clones Ura⁻ originados a partir de cada uno de los dos transformantes seleccionados. Para detectar claramente este fenotipo, se sembraron gotas de suspensiones de los clones Ura⁻ con un número determinado de células (100 y 1000) y éstas fueron incubadas a las distintas temperaturas. De esta manera, y utilizando como control de crecimiento la estirpe heterocigótica CNC21, se seleccionaron aquellos clones cuyo crecimiento a 42 °C era prácticamente nulo. Estos eran:

- “1.3” y “1.49” que provenían de CSM1-I.
- “2.5”, “2.130”, “2.138”, “2.139”, “2.148”, “2.179” y “2.181” que provenían de la estirpe CSM7-2.

2.10.4. Estudio de distintos clones termosensibles.

Los mutantes termosensibles seleccionados anteriormente fueron sometidos a distintos tipos de estudios simultáneamente.

Análisis del *locus* del gen *CaSEC14* en el genoma de los mutantes termosensibles:

Con una hibridación DNA-DNA se comprobó que la reorganización que se había producido en el *locus* *CaSEC14* al producirse la expulsión del marcador había sido la esperada (figura 28 carriles D y E), de manera que todos los clones seleccionados portaban un alelo interrumpido y otro con una sola copia de *CaSEC14* que podría ser silvestre o mutante.

Estudio del crecimiento y la filamentación:

Debido a que el crecimiento de las estirpes Ura- en placa era claramente diferente al de la cepa CNC21 de la que provienen, se realizó un estudio preliminar de su capacidad de filamentación, utilizando como control la cepa CA14 (Ura-). Este experimento se realizó en suero de ternera fetal a 37°C y, debido que a esta temperatura alguno de los clones podían presentar defectos de crecimiento, los cultivos se compararon en todos los casos con los mismos clones creciendo en YED a 30°C. En muchos de los casos se observó cierto grado de lisis celular en los cultivos a 37°C. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

Tabla IX. Morfología presentada por diferentes clones termosensibles de *C. albicans* tras 24 h de incubación en YED a 30 °C y en suero a 37 °C

Clon	YED, 30°C	suero, 37°C
CA14	Levaduras y células en cadenas	Filamentos
"1.3"	Igual que CA14	Filamentos (en mayor proporción que en CA14). Porcentaje bajo de células lisadas
"1.49"	Igual que CA14	Filamentos (proporción similar a la de CA14). Lisis en mayor proporción que en "1.3"
"2.5"	Cadenas ramificadas de células ovaladas y algunos filamentos más gruesos que los del control	Levaduras. La mayoría de las células negras y lisadas
"2.130"	50 % de células ovaladas en cadenas, algunas levaduras y filamentos gruesos no ramificados	Lisis celular total, no se observan células
"2.138"	Igual que "2.5".	Filamentos más largos que los de CA14 y restos celulares de células lisadas
"2.139"	Igual que "2.5"	Filamentos y porcentaje bajo de células lisadas
"2.148"	Igual a "2.5"	Levaduras y gran cantidad de restos de lisis celular
"2.179"	Igual que CA14	Lisis celular. Se observan filamentos cortos negros y lisados
"2.181"	Igual que CA14	Algunos filamentos, mucha lisis celular

Como se puede observar en los datos expuestos en la tabla, en YED a 30 °C (condiciones que no inducen la filamentación) en los clones originados a partir de CSM1-I ("1.3" e "1.49") se observaban células con una morfología igual a la del control (CA14),

mientras que en los mutantes procedentes de CSM7-2 se podían ver algunas células aberrantes, con formas de filamentos más gruesos o más largos de lo normal. En suero a 37 °C (condiciones de filamentación) en todos los mutantes aparecían restos de células lisadas, pero el grado de lisis era muy diferente según el mutante. La capacidad de filamentación también era muy variable en dichos mutantes, ya que, mientras en algunos se observaban filamentos más largos que los del control, en otros sólo se detectaban células levaduriformes.

Recuperación y secuenciación de algunos de los supuestos alelos mutados:

Para comprobar si realmente se encontraban las mutaciones *Casec14-1* o *Casec14-7* en el genoma de los clones analizados, se procedió a amplificar por PCR la zona del alelo de *SEC14* donde debería localizarse la mutación. Para ello, DNAs genómicos extraídos de las estirpes de *C.albicans* "1.49", "2.5", "2.130", "2.138", "2.139" y "2.148" fueron utilizados como moldes en amplificaciones en las que se utilizaron como cebadores "luc4" y "amplisec" (señalados en la situación 4 de la figura 28). En estas PCRs, se obtenían dos bandas, una de un tamaño de 823 pb correspondiente al alelo de interés, y otra de 1,4 kb procedente de la amplificación del alelo interrumpido. La banda menor se cortó con las enzimas de restricción *EcoRI* y *AvaII* en el caso de los clones "1.49", "2.5", "2.130" y "2.139" y con *EcoRI* y *HindIII* en "2.138" y "2.148", para su posterior subclonación en pUC19. La secuenciación de los plásmidos obtenidos reveló que en ninguno de los casos se había rescatado el alelo mutante termosensible, sino que, por el contrario, la secuencia obtenida compartía un 100 % de homología con el alelo silvestre de *CaSEC14*.

El fenotipo diferencial presentado por estos clones podía estar ocasionado por otras mutaciones en el gen *SEC14*, mutaciones producidas en las zonas adyacentes del genoma debidas a los procesos de recombinación sufridos o, incluso, algún cambio que hubiera tenido lugar en otras zonas del genoma.

2.10.5. Búsqueda mediante PCR de clones que porten en su genoma los alelos termosensibles *Casec14-1* y *Casec14-7*.

Debido a que se había encontrado una serie de cepas de *C. albicans* con fenotipos interesantes, pero que, al analizar su genotipo no se encontraba la mutación esperada, se decidió proceder de manera inversa en la búsqueda de los mutantes termosensibles. Se trató, en primer lugar, de localizar la mutación en el genoma de las cepas objeto de estudio y, posteriormente, realizar un estudio más profundo de sus características fenotípicas. Para ello, se diseñó un oligonucleótido en la zona de la mutación, "1119ts" (figura 29A, tabla VIII), cuya secuencia contiene la zona mutada del alelo *Casec14-7*. Este cebador, "1119ts", permite distinguir entre los clones que llevan en su genoma el alelo silvestre y los que portan los alelos mutantes, ya que presenta mayor zona homóloga con estos últimos. Como pareja de "1119ts" en la amplificación, se utilizó "luc5" que, debido a que hibrida en el interior de la zona de *CaSEC14* deletada en uno de los alelos, evitaba que se produjera la amplificación de este alelo interrumpido.

Para poner a punto las condiciones restrictivas del experimento de PCR, en el que se amplificara la banda esperada en los casos de los alelos mutantes y no en el caso del alelo silvestre, se utilizaron como controles los plásmidos pSLK6, pSLK7M1 y pSLK7M7

(figura 29B). Se pudo comprobar que la temperatura óptima de hibridación de los cebadores para conseguir discernir entre alelo silvestre y alelos mutados era 46°C.

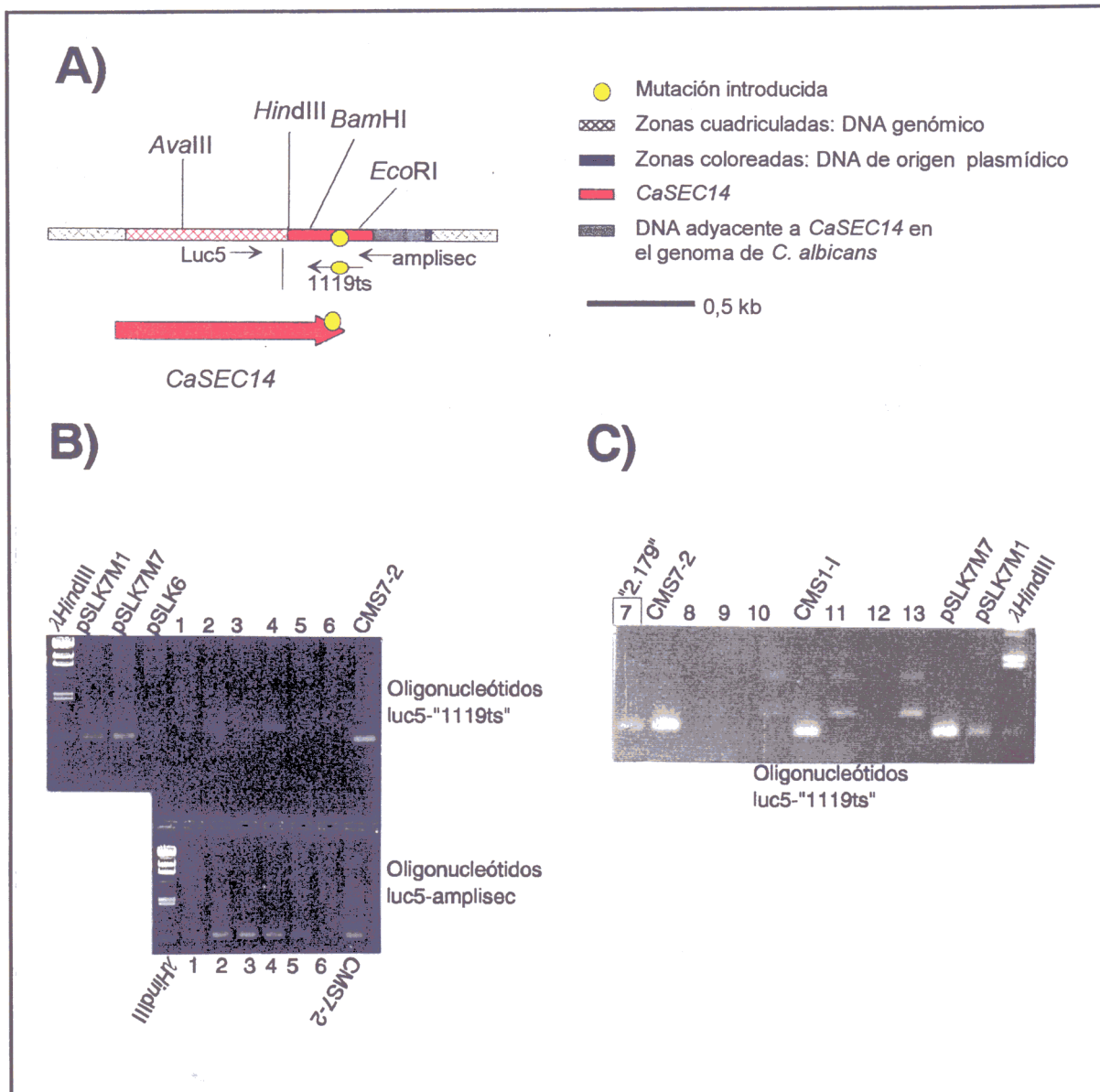


Figura 29. Detección mediante PCR de los alelos mutantes *Casec14-1* y *Casec14-7* en el genoma de *C. albicans*. A) Esquema de los fragmentos de DNA que se amplifican utilizando las parejas de oligonucleótidos “luc5”-“ampliseq” y “luc5”-“1119ts”. B) y C) Detección mediante PCR de los alelos mutantes de *CaSEC14*, en plásmidos (pSLK7M1 y pSLK7M7) y DNA genómico de distintos clones termosensibles. En los carriles numerados se amplificó el DNA genómico de distintos clones obtenidos después de la expulsión del marcador (“1.3”, “1.49”, etc). CMS7-2 y CMS1-1 son las cepas Ura⁺ de las que provienen los clones Ura⁻ analizados y que se utilizaron como control positivo. pSLK7M1 y pSLK7M7 también se utilizaron como control positivo y pSLK6 como control negativo. Solamente en el caso del don “2.179” (don 7, en figura c) se amplificó una banda de exactamente el mismo tamaño que los controles. (Las condiciones de las PCRs con las dos parejas de oligonucleótidos son las mismas: 1º: un ciclo a 97 °C/2’; 92 °C/4’; 46 °C/1’; 72 °C/30’; 2º: treinta y un ciclos a: 92 °C/1’ 30’; 46 °C/1’; 72 °C/30’ y 3º: un ciclo a 92 °C/1’ 30’; 46 °C/1’; 72 °C/10’).

Se analizó de esta forma, el DNA de algunos de los clones Ura- cuyo alelo ya había sido recuperado (como controles), así como el de nuevos clones en que se pudiera detectar una de las mutaciones esperadas (figura 29B y C). En todos los experimentos se pusieron como controles los plásmidos anteriormente comprobados y se amplificaron simultáneamente los mismos DNAs genómicos con los oligos "luc5" y "amplisec" (que tenían que amplificar una banda de 637 pb tanto en los casos en los que estuviera la mutación termosensible como en los que estuviera el alelo silvestre). De esta forma en el caso de que con "1119ts" no se hubiera amplificado ninguna banda se podría descartar que la cantidad o calidad del DNA molde no fuera la óptima. En las amplificaciones con "1119ts" y "luc5" se pudieron detectar 3 tipos de resultados (figura 29B y C):

- En muchos de los clones analizados no se amplificó ninguna banda (clones que llevan el alelo silvestre)
- en algunos clones aparece una banda de un tamaño algo mayor al de la banda esperada y de intensidad menor a la de los controles.
- únicamente el clon "2.179" presentaba una banda de igual tamaño que la de los controles (clon 7, figura 29C).

La cepa *C. albicans* "2.179" había sido seleccionada anteriormente por su fenotipo termosensible. Además, en el estudio de su capacidad de filamentación se había observado que se producía lisis a 37°C en un porcentaje elevado (tabla IX) y mediante Southern blot se había comprobado que la organización del *locus SEC14* era la esperada (figura 28). Debido a todo ello, se consideró interesante ahondar en el estudio tanto fenotípico como genotípico de este mutante.

2.10.6. Análisis fenotípico y genotípico de *C. albicans* "2.179".

Un estudio fenotípico preliminar de la estirpe de *C. albicans* "2.179", permitió detectar una inestabilidad fenotípica muy elevada. En YED a 30 °C se observaban dos tipos de colonias, unas grandes y otras muy pequeñas. Aislado cada tipo de colonia se comprobó que, mientras de la colonia grande volvían a crecer colonias grandes y pequeñas, de la colonia pequeña solamente crecían colonias pequeñas. En SD+sueros de ternera fetal a 37°C también crecían dos tipos de colonias, unas lisas y las otras rugosas y totalmente planas (figura 30). A partir de una colonia lisa aparecían nuevamente colonias lisas y rugosas, mientras que a partir de células de las colonias rugosas crecían únicamente colonias rugosas. La morfología colonial se correspondía, como era de esperar, con la morfología celular. En las colonias lisas la mayoría eran células levaduriformes (aunque también había algunos tubos germinativos, células aberrantes, poligonales o muy grandes, y restos de células lisadas) y las rugosas estaban formadas por conjuntos de filamentos.

Otro fenómeno observado en todas las células del mutante es la elevada adherencia que presentan entre ellas, ya que se encuentran siempre más unidas que las células de las estirpes parentales (figura 30).

Otro de los fenotipos interesantes observados en este mutante era la lisis celular casi total que se producía en algunos casos en condiciones de filamentación, y que también podía ser detectada en placa a 37°C con BCIP.

Para verificar la existencia de la mutación introducida en el genoma de *C. albicans* "2.179", su DNA genómico fue amplificado con los oligonucleótidos "luc5" y "amplisec"

(figura 29A) y el fragmento *EcoRI* y *HindIII* de la banda amplificada se subclonó en pUC19 para su posterior secuenciación. Los datos obtenidos de la secuencia indicaban que se trataba de un alelo silvestre de *CaSEC14*. Para descartar que, por error en el experimento de PCR, se hubiera amplificado el alelo interrumpido del genoma del clon "2.179" (ya que en ese alelo continúa existiendo la zona final en donde se ha introducido la mutación en los alelos mutados), se secuenció hasta dla diana de la enzima *HindIII*, comprobando que no se había amplificado el alelo interrumpido, ya que no se obtuvo ninguna zona de la secuencia homóloga a *hisG*. (Posibles explicaciones a este resultados se plantean en la discusión)

Buscando una posible explicación a los fenotipos observados en este mutante, se trató de conocer si podían deberse a un defecto en cualquier otra zona de *CaSEC14*. Para ello, se procedió a tratar de recuperar el fenotipo parental, transformando integrativamente el gen silvestre en otro *locus* del genoma de la cepa mutante. Con este objetivo, se construyó el plásmido pSECAR, el cual proviene de un pUC19 y, además de contener el gen *CaSEC14* de *C. albicans* y el gen *CaURA3* como marcador de selección, también lleva el gen *ARG5,6* de *C. albicans*, que nos permitiría dirigir la transformación hacia ese *locus* del genoma.

La cepa mutante "2.179" fue transformada con pSECARG, así como con pAN3 como control (plásmido que porta *CaARG5,6*, *CaLEU2* y *CaURA3* y tiene aproximadamente el mismo tamaño que pSECAR), ambos cortados en el *locus ARG5,6*. En los transformantes obtenidos se observó que:

- No se recuperaba el crecimiento normal a 37 °C, ya que en los transformantes de cualquiera de los plásmidos se detectaba lisis con BICP.

- La adherencia de las células de todos los clones transformantes continuaba siendo tan elevada como en el caso del mutante "2.179".

- El fenotipo colonial en SD+siero a 37 °C de los transformantes era diferente al del mutante "2.179", tanto en el caso de pSECAR como como en del plásmido control, pAN3.

Este conjunto de datos sugiere que el fenotipo presentado por el mutante termosensible de *C. albicans*, "2.179" podía ser debido a alguna mutación en otro punto del genoma de *C. albicans* distinto del *locus CaSEC14* y, por lo tanto, el estudio más profundo de sus características fenotípicas y genotípicas parecía no estar muy relacionado con el trabajo aquí expuesto.

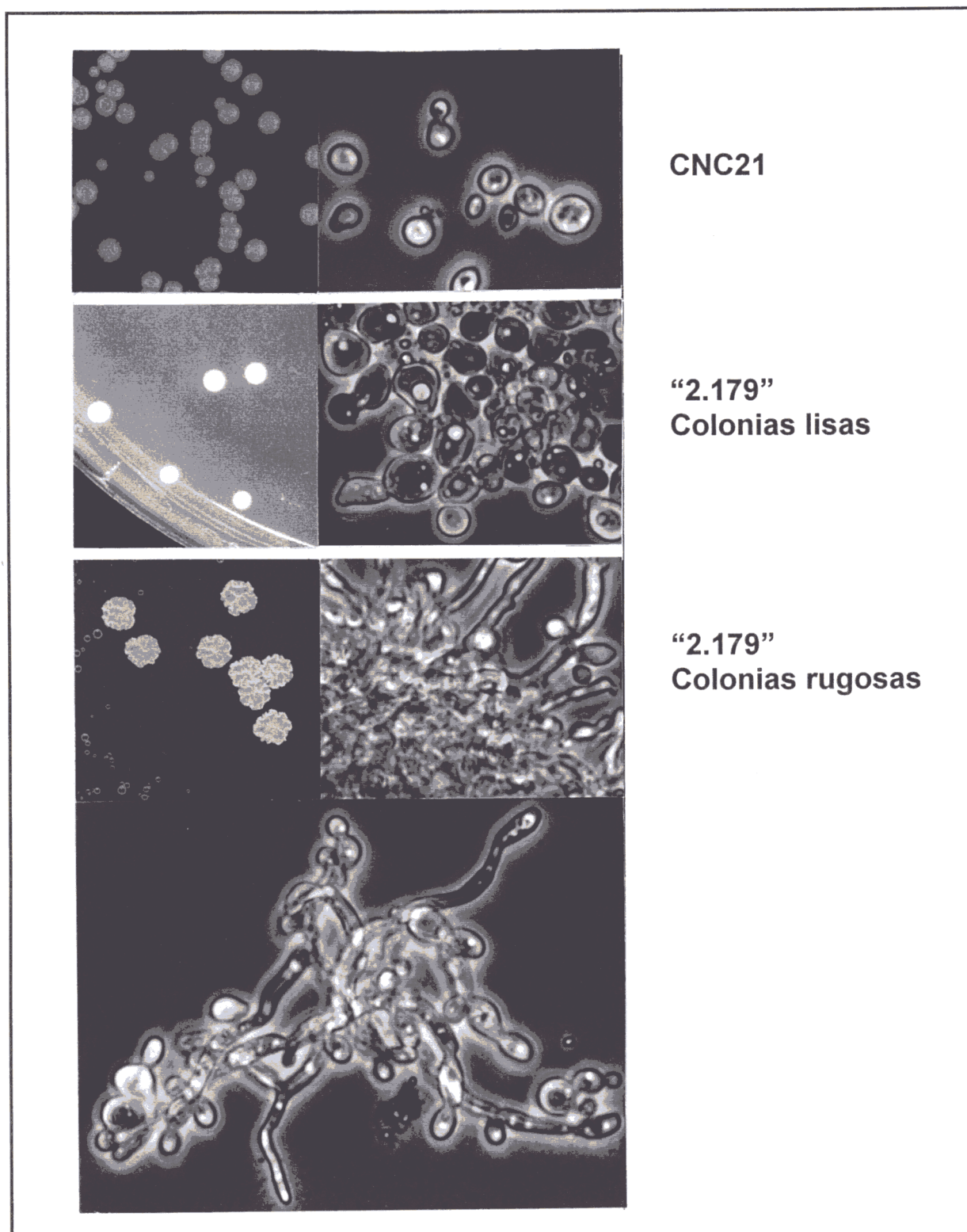


Figura 30 Morfología colonial y celular de *C. albicans* “2.179”. A la derecha, morfología colonial y a la izquierda, morfología celular de cada uno de los tipos de colonias. Se muestra la morfología de *C. albicans* CNC21 como control. En la parte inferior se observa un detalle de los filamentos de las colonias rugosa del clon “2.179”.

2.11. Análisis de la proteína CaSec14p en *C. albicans* y *S. cerevisiae*.

El peso molecular teórico deducido basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína CaSec14p es de 34,7 kDa. Para obtener más información sobre CaSec14p, así como para comprobar si existía variación entre la cantidad de esta proteína existente en las cepas SC5314 (silvestre) y CNC20 o entre el aislado clínico *C. albicans* 1001 y el mutante morfológico *C. albicans* 92' (Nombela *et al.*, 1987) en el que se ha descrito una disminución del contenido de PI en membranas (Koul *et al.*, 1995), se realizó un análisis por Western blot de extractos celulares de dichas cepas de *C. albicans* con anticuerpos frente a Sec14p de *S. cerevisiae* (cedidos por el Dr. V. Bankaitis) (figura 31A). Está descrito que estos anticuerpos, además de reconocer la proteína Sec14p de *S. cerevisiae*, reconocen también las proteínas homólogas de otras levaduras como *K. lactis* y *S. pombe* (Bankaitis *et al.*, 1989), las cuales presentan un porcentaje de homología con Sec14p de *S. cerevisiae* similar al existente entre Sec14p de *S. cerevisiae* y de *C. albicans*. Esto hacía esperar que los anticuerpos frente a la proteína de *S. cerevisiae* reconocieran CaSec14p.

En este experimento de hibridación (figura 31A) se observó en las cepas de *S. cerevisiae* la proteína a la altura esperada de 37 kDa (Bankaitis *et al.*, 1989). En todas las cepas de *C. albicans* se detectó una banda de un tamaño (aproximadamente 60 kDa) bastante mayor al esperado para la proteína codificada por el gen *CaSEC14*. La banda detectada tenía una intensidad muy elevada y constante en las distintas cepas de *C. albicans*. Para comprobar si esta banda correspondía realmente con la proteína codificada por el gen *CaSEC14*, se realizó otro experimento de hibridación con anticuerpos, en el que se incluyó el análisis de extractos celulares de cepas de *S. cerevisiae* transformadas con distintos plásmidos. Dichos plásmidos incluían el gen *CaSEC14* o fragmentos de éste en vectores centroméricos y episómicos (figura 31B).

En la figura 31B se puede observar que en los camiles en que se analizaron cepas transformadas con el plásmido pLM1 (plásmido episómico con todo el gen *CaSEC14*) se detectó la banda correspondiente a esta proteína con una intensidad mucho mayor que en el caso del transformante con pCEN1 (plásmido centromérico que incluye todo el gen *CaSEC14*), resultado esperado, ya que en este último transformante sólo existe una copia del gen. Este resultado indica que la banda detectada correspondía a la proteína codificada por *CaSEC14* y que ésta es reconocida de manera muy clara por los anticuerpos frente a Sec14p de *S. cerevisiae*, por lo cual la banda observada en las cepas de *C. albicans* también correspondía a CaSec14p a pesar del tamaño inesperado. Por tanto, CaSec14p cuando es expresada en *S. cerevisiae* presenta el tamaño esperado según la secuencia del gen, mientras que, cuando se produce en *C. albicans* presenta un tamaño mucho mayor. Estos resultados indican que CaSec14p en *C. albicans* puede sufrir algún tipo de procesamiento post-traducciona l que aumente su masa aparente o puede encontrarse unido a otra proteína formando un complejo estable que no se disocie en las condiciones de este experimento (ver discusión).

En la cepa de *S. cerevisiae* transformada con un plásmido multicopia que no incluye el gen *CaSEC14*, pLM13, no se detectó más hibridación que la correspondiente al gen de *S. cerevisiae*, lo que corrobora que la banda detectada en los casos de pLM1 y pCEN1 correspondía a CaSec14p. En ninguno de los casos en que el plásmido introducido en la cepa de CTY1-1A portaba únicamente un fragmento de *CaSEC14* (pLM1a, pLM1b y pLY1) se detectaba la banda correspondiente a dicho fragmento de proteína. Existen varias explicaciones posibles para este hecho:

-Puede que el fragmento de gen no se traduzca (pLM1a sólo lleva algunos aminoácidos de la parte final del gen y no se han situado bajo el control de ningún promotor, por lo que lo más probable es que ese fragmento de *CaSEC14* no se traduzca).

-Aunque el fragmento del gen que porta el plásmido se traduzca (en el caso de pLY1 sabemos que se traduce porque es capaz de complementar el fenotipo termosensible de CTY1-1A, resultados, punto 2.4) puede que no se obtenga la conformación adecuada para ser reconocida por los anticuerpos.

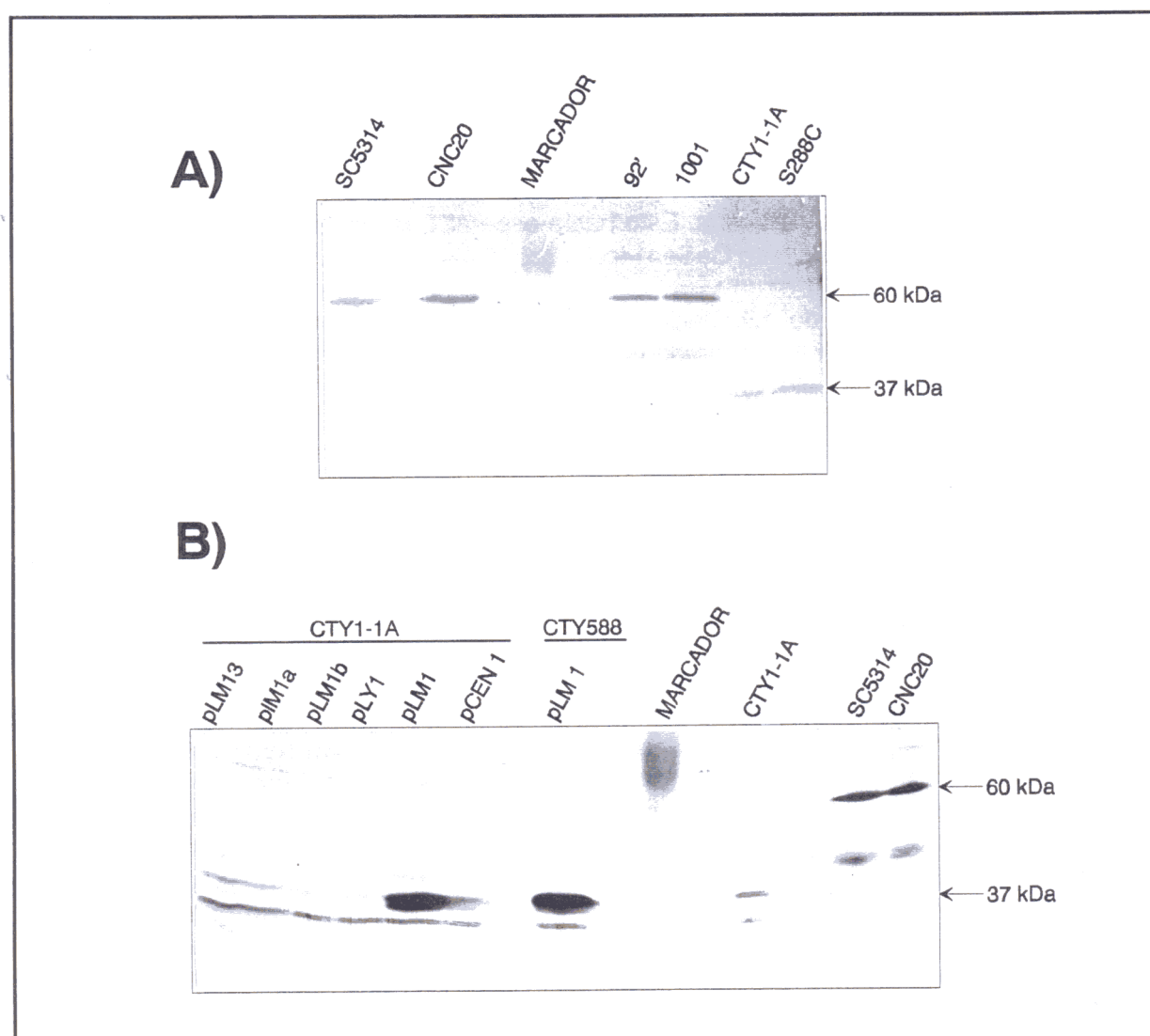


Figura 31. Análisis por Western blot de CaSec14p en extractos celulares de *C. albicans* y *S. cerevisiae*. A) Distintas cepas de *C. albicans* (SC5314, CNC20, 1001 y 92') y *S. cerevisiae* (CTY1-1A y S288C). B) Cepas de *S. cerevisiae* (CTY1-1A y CTY588) transformadas con plásmidos que portan distintos fragmentos del gen *CaSEC14* y cepas de *C. albicans* (SC5314, CNC20). La banda de 37 kDa señalada corresponde con la proteína Sec14p de *S. cerevisiae* (Bankaitis *et al.*, 1989) y la de 60 kDa a CaSec14p en *C. albicans*. Los plásmidos se describen en la tabla VII y en la figura 12.

3. PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE FOSFATIDILINOSITOL Y FOSFATIDILCOLINA HUMANAS.

Para la aplicación de *CaSEC14* como posible diana de agentes antifúngicos, con el objeto de evitar posibles problemas de toxicidad del futuro fármaco, es interesante el estudio de las proteínas humanas homólogas a este gen. Se ha sugerido que las PITPs de mamíferos son las proteínas homólogas, en su función, a la proteína Sec14p de levadura, a pesar de no existir homología entre sus secuencias (comentado en la introducción y la discusión). Esto apoya la idea de utilizar *CaSEC14* como diana en la búsqueda nuevos antifúngicos, ya que es posible que facilite la obtención de sustancias que inhiban diferencialmente la proteína del hongo y la de los mamíferos.

Con el objeto de ahondar más en este punto, se procedió al estudio de la capacidad de complementación de las isoformas α y β de la PITP humana en mutantes de levadura en el gen *SEC14*.

3.1. Construcción de plásmidos que codifican las proteínas humanas PITP α y PITP β .

Para el estudio de la capacidad de complementación de las proteínas humanas PITP α y PITP β en mutantes en el gen *SEC14* de *S. cerevisiae*, los genes que las codifican fueron amplificados mediante PCR y, posteriormente, subclonados bajo el control del promotor GAL1.

Para la amplificación de estos genes se utilizó como molde de DNA humano una genoteca de cDNA de células Hela. Las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican las proteínas PITP α y PITP β humanas se encontraron en la base de datos SWISS-PROT donde se denominan, respectivamente, PPI1_HUMAN y PPI2_HUMAN. A partir de estas secuencias se diseñaron 3 oligonucleótidos (figura 32 y tabla VIII):

PPI α nic: hibrida con el inicio del ORF de *PPI1* y *PPI2* e introduce una diana de corte de la enzima *Bam*HI. (Debido a la elevada homología entre las secuencias de *PPI1* y *PPI2* fue posible utilizar este cebador en la amplificación de ambos genes).

PPI1fin: hibrida con el final del ORF de *PPI1* e introduce un corte *Eco*RI.

PPI2fin: hibrida con el final del ORF de *PPI2*. (Incluye una diana de corte de la enzima *Xba*I que, en realidad, se encuentra al final del ORF de *PPI2*. Al digerir la banda de amplificación de *PPI2* con *Xba*I, se elimina la última base de su ORF así como el codón de terminación, pero su suclonación posterior en otro punto de corte *Xba*I permite la regeneración de la diana y que se complete, de este modo, la secuencia del ORF y su codón de terminación).

Ambos ORF fueron amplificados y subclonados en el sitio de clonación múltiple de pYES2 (vector episómico y de expresión en *S. cerevisiae*) para construir los plásmidos pYPI α y pYPI β . En dichos plásmidos la expresión de ambos ORFs está sometida a la regulación del promotor GAL1.

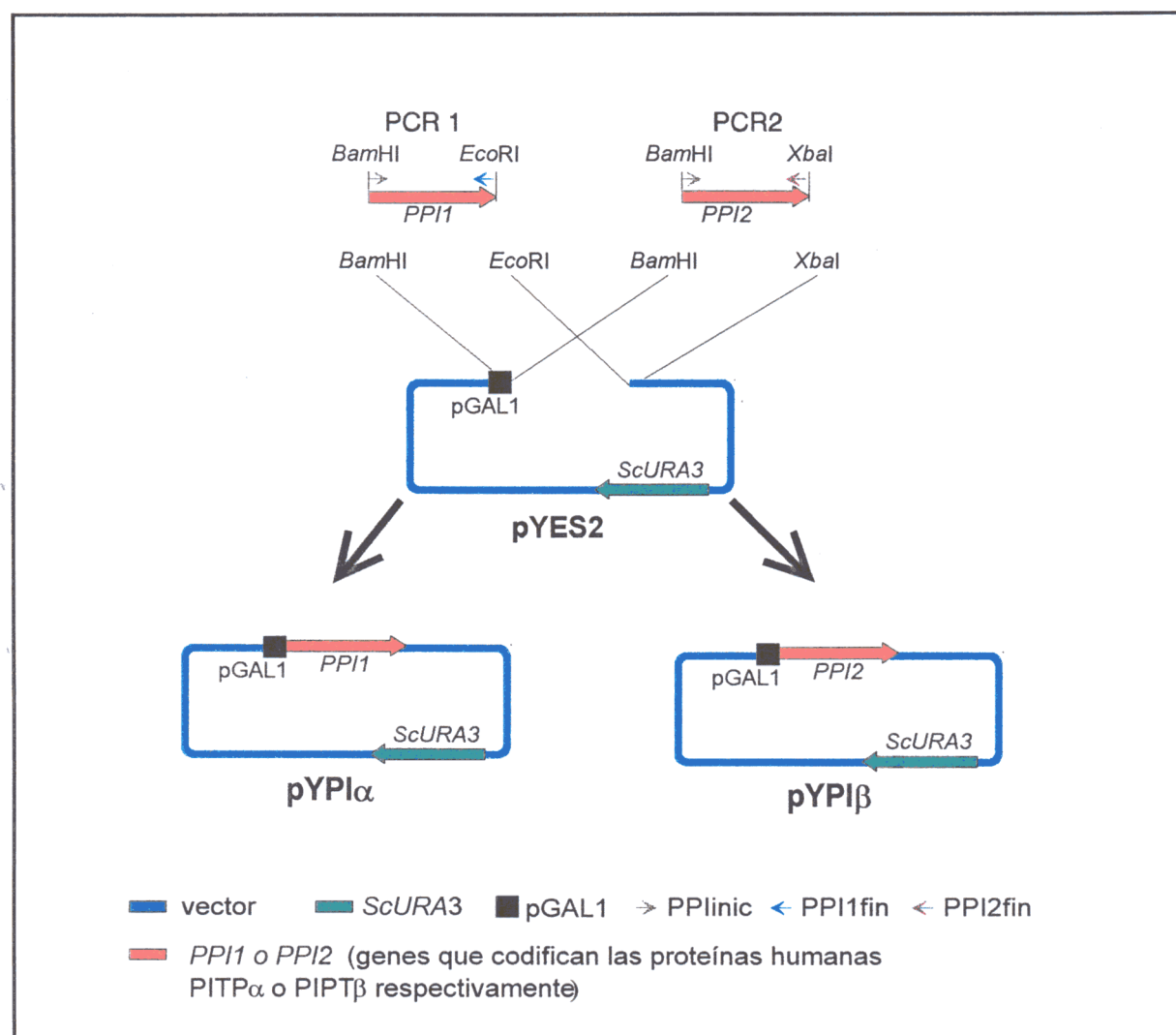


Figura 32. Construcción de los plásmidos con las PITPs humanas, bajo el control del promotor GAL1: pYPI α y pYPI β . Para la amplificación de *PPI1* se utilizaron los cebadores *PPI*_{linic} y *PPI1*_{fin} y las siguientes condiciones: 1º: un ciclo a 97 °C/4'; 2º: dos ciclos a 94 °C/30"; 58 °C/30"; 72 °C/1'; 3º: veintiocho ciclos a: 94 °C/30"; 60 °C/30"; 72 °C/1' y 4º: un ciclo a 94 °C/30"; 60 °C/30"; 72 °C/10'. Para la amplificación de *PPI2* se utilizaron los oligonucleótidos *PPI*_{linic} y *PPI2*_{fin} que amplificaron una banda de 833 pb con las mismas condiciones que para *PPI1* (excepto que en el 2º paso se cambió la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos de 58 a 57 °C.). Las PCRs, después de ser digeridas con las enzimas de restricción adecuadas, fueron subclonadas en el plásmido de expresión en *S. cerevisiae* pYES2 bajo el control del promotor GAL1.

3.2. Capacidad de las proteínas PITP α y PITP β humanas de complementar mutantes de *S. cerevisiae* en el gen *SEC14*.

3.2.1. Complementación de un mutante *sec14*^{ts} de *S. cerevisiae*.

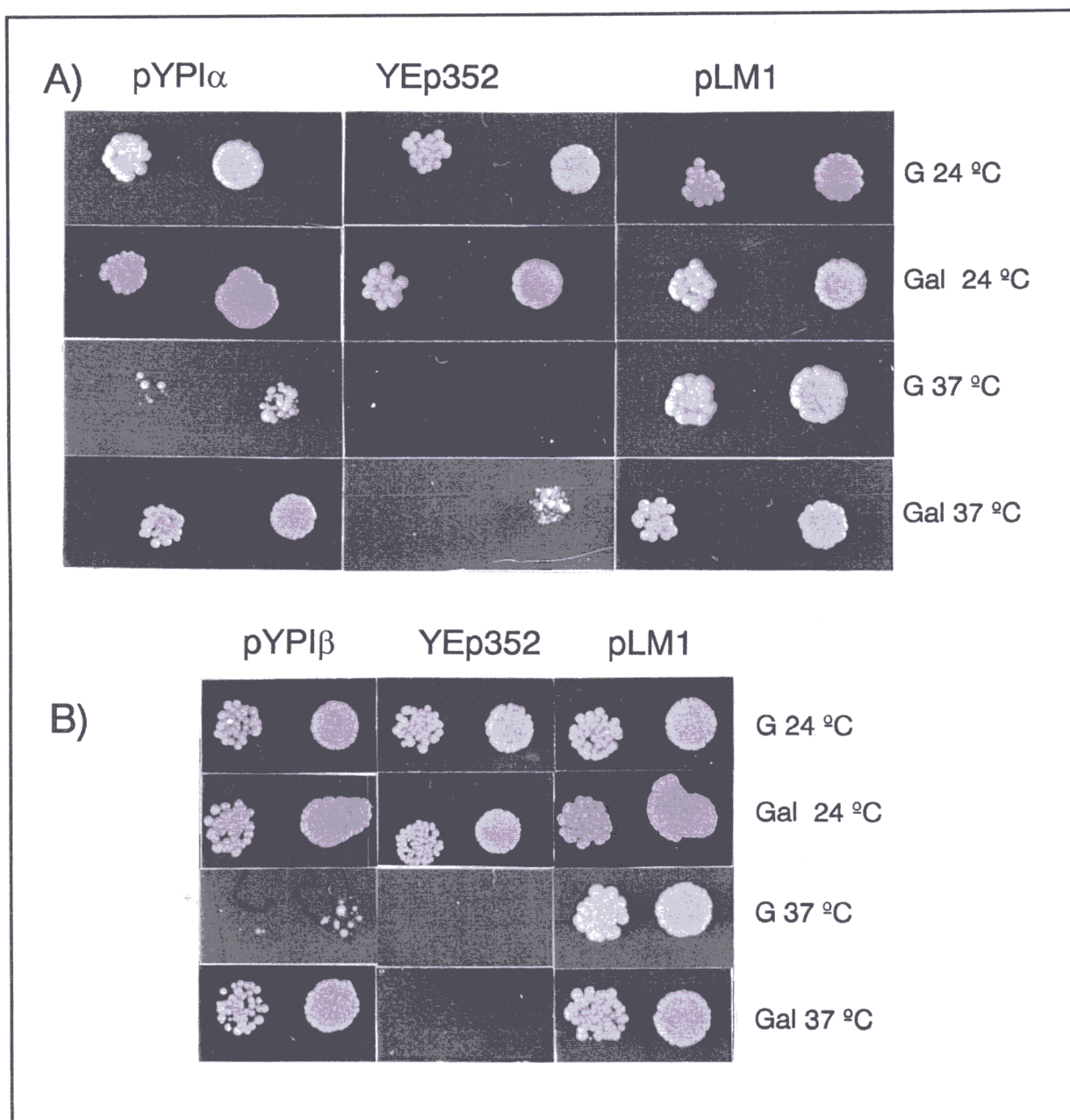


Figura 33. Estudio de la complementación del fenotipo termosensible de CTY1-1A por las PITPs humanas. El mutante CTY1-1A transformado con los plásmidos pYPI α (A), pYPI β (B), YE352 (control negativo de complementación) y pLM1 (control positivo de complementación; porta *CaSEC14* que complementa el mutante pero que no está regulado bajo el control del promotor GAL1) se sembró en medio sólido con distintas fuentes de carbono. Gotas que contenían 1000 células (a la derecha de cada uno de los casos) y 100 células (izquierda) se sembraron en SD (G, glucosa) y SG (Gal, Galactosa) y fueron incubadas a 24 °C y 37 °C (temperatura restrictiva).

Con el objeto de comprobar si las proteínas PITP α y PITP β eran capaces de complementar el defecto de crecimiento a 37 °C producido por la mutación *sec14^{ts}* en *S. cerevisiae*, el mutante CTY1-1A se transformó con los plásmidos pYPl α y pYPl β y se estudió la capacidad de crecimiento de dichos transformantes en distintas fuentes de carbono a la temperatura restrictiva (figura 33).

En el ensayo en medio sólido se comprobó claramente que en los plásmidos pYPl α y pYPl β , los genes *PPI1* y *PPI2* están regulados por el promotor GAL1. Además, los resultados obtenidos muestran que ambas isoformas de la proteína humana PITP son capaces de complementar el defecto de crecimiento que el mutante termosensible en el gen *SEC14*, CTY1-1A, presenta a la temperatura restrictiva de 37 °C. Este resultado era similar al obtenido en el caso de las PITPs bovinas, que presentan unos porcentajes de homología con las proteínas humanas elevadísimos (98,9 % y 98,1 % con PITP α y PITP β , respectivamente (Dickenson *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1995)) y que, en un plásmido multicopia, también son capaces de complementar este mutante (Skinner *et al.*, 1993; Tanaka y Hosaka, 1994).

3.2.2. Las PITPs humanas pueden sustituir la función de Sec14p en S. cerevisiae.

Para determinar si pYPl α y pYPl β eran capaces de complementar la falta de viabilidad de un mutante de *S. cerevisiae* con el gen *SEC14* interrumpido, la cepa CTY588 (*sec14 Δ 1::HIS3/pCTY11*; pCTY11 incluye los genes *LEU2*, *ADE3* y *SEC14* de *S. cerevisiae*; tabla IV) se transformó con pYPl α , pYPl β y con pLM1 como plásmido control. De esta forma, se obtuvieron cepas de *S. cerevisiae* que portaban dos plásmidos con distintos marcadores (SSC01, SSC02 y SSC03, tabla V) y en ellas se forzó la expulsión de pCTY11. Seleccionando los clones en los que se había expulsado pCTY11 fueron obtenidas las cepas SSC11 (*sec14 Δ 1::HIS3/pLM1*), SSC12 (*sec14 Δ 1::HIS3/pYPl α*) y SSC13 (*sec14 Δ 1::HIS3/pYPl β*), en las cuales pCTY11 se había sustituido por los plásmidos pLM1, pYPl α y pYPl β . Este experimento se realizó en SG (suplementado con los aminoácidos necesarios en cada paso) para que *PPI1* y *PPI2*, que están regulados bajo el promotor GAL1, se encontraran constantemente inducidos. Para comprobar que el intercambio plásmidico se había realizado de la manera adecuada, los plásmidos fueron recuperados de las cepas SSC11, SSC12 y SSC13 y, mediante un análisis de restricción, se comprobó que no había ocurrido ninguna recombinación inesperada.

La posibilidad de obtener las cepas SSC12 y SSC13 indica, sin lugar a dudas, que cualquiera de las dos isoformas de la PITP humana, en las condiciones ensayadas, es capaz de complementar un mutante interrumpido en el gen *SEC14* de *S. cerevisiae*. Debido a que este gen es esencial para el crecimiento de la levadura, esto implica que las proteínas humanas, PITP α y PITP β , son capaces de sustituir la función de Sec14p en *S. cerevisiae*.

Este resultado es de una gran relevancia, ya que apoya la teoría de que las proteínas de transferencia de fosfatidilinositol son las que realizan en las células de mamífero las funciones homólogas las realizadas por Sec14p en la levadura. Este dato es muy interesante para la posible utilización de CaSEC14 como diana para el desarrollo de nuevos y selectivos agentes antifúngicos (ver discusión). Además, el único dato existentes hasta la fecha sobre la capacidad de alguna PITP de mamíferos de

complementar un mutante de levadura *sec14* interrumpido apuntaba que, contrariamente a lo aquí expuesto, esa proteína no tenía la capacidad de complementar dicho mutante (Skinner *et al.*, 1993)(discusión, punto 4).

ABRIR DISCUSIÓN





ABRIR RESULTADOS

DISCUSIÓN

1. INTERÉS DE LA CLONACIÓN DE CASEC14.

En todas las células eucariotas, la ruta de secreción de proteínas juega un papel primordial en el transporte y la maduración de muchas proteínas imprescindibles para la vida celular. Así, en las distintas especies de levaduras, las proteínas secretadas al exterior de la célula y las que se localizan en la pared celular, el espacio periplásmico, la membrana plasmática o cualquiera de los orgánulos de la ruta de secreción alcanzan dicha localización después de transitar a través de los distintos compartimentos de esta ruta. Debido a la elevada importancia de este proceso de secreción de proteínas en la vida de la levadura, la mayoría de los genes implicados en él son esenciales para su crecimiento.

El proceso de secreción en la levadura patógena *Candida albicans*, además de ser clave para el crecimiento y viabilidad celular, también juega un papel importante en la patogenicidad, ya que algunas enzimas líticas son secretadas al medio externo actuando como factores de virulencia (por ej: fosfolipasa, proteinasa aspártica (Culter, 1991)). A pesar de su relevancia, hasta la fecha existen muy pocos datos sobre dicho proceso en *C. albicans*. Por esto, la profundización en los mecanismos moleculares que lo regulan se presentaba como un tema de gran interés en el momento del inicio del trabajo expuesto en la presente memoria.

Uno de los genes implicados en el proceso de secreción de proteínas en *S. cerevisiae* es *SEC14* (Bankaitis *et al.*, 1989). Este gen presentaba ciertas características que apoyaban el interés del estudio del posible gen homólogo en *C. albicans*:

- Se conocía la existencia de genes homólogos a *SEC14* en otras levaduras como *K. lactis* (Salama *et al.*, 1990) y *S. pombe* (Bankaitis *et al.*, 1989). Esto hacía esperar que también existiera un homólogo en *C. albicans*.

- La posibilidad de que *SEC14* fuera un gen esencial en *C. albicans* como lo es su homólogo de *S. cerevisiae* (Bankaitis *et al.*, 1989), unida a la existencia de un ensayo enzimático que permite detectar la actividad del producto génico (Aitken *et al.*, 1990) son dos características idóneas para pensar en su utilización como posible diana en el desarrollo de nuevos antifúngicos. La obtención de nuevos y efectivos antifúngicos es uno de los intereses principales en la investigación sobre *C. albicans*, con el objetivo de solucionar el problema clínico que presenta este microorganismo.

- Durante el transcurso de este trabajo, se ha descrito la intervención del gen *SEC14* de *Y. lipolytica* en la regulación del proceso de transición morfológica existente en dicha levadura (Lopez *et al.*, 1994). La posibilidad de que el gen homólogo de *C. albicans* estuviera implicado en la regulación de la filamentación, aumentaba aún más el interés de su estudio. El estudio de la transición dimórfica de *C. albicans* tiene una gran importancia por ser un proceso de diferenciación celular muy interesante cuyo mecanismo molecular no se ha dilucidado hasta el momento, además de por su posible, aunque controvertida, relación con la capacidad patógena de este microorganismo.

Debido al gran interés que parecía tener la descripción del gen homólogo a *SEC14* en *C. albicans*, se procedió a su clonación mediante complementación funcional de un mutante

de *S. cerevisiae* *sec14^{ts}* con una genoteca genómica de *C. albicans*. Tras la secuenciación del gen clonado, *CaSEC14*, se comprobó que era bastante similar a su homólogo de *S. cerevisiae*. Sin embargo *CaSEC14* no presenta intrones en oposición a sus homólogos en *S. cerevisiae* (Bankaitis *et al.*, 1989) y *Y. lipolytica* (Lopez *et al.*, 1994). Esto también ocurre en el caso de los genes que codifican la enzima fosfomanosa isomerasa; ya que mientras los genes de *S. cerevisiae* y *Aspergillus nidulans* contienen un intrón en la misma posición en ambos, el homólogo de *C. albicans*, *PMI1*, no presenta ningún intrón (Smith *et al.*, 1995).

2. CASEC14 ES UN GEN ESENCIAL.

La esencialidad de *CaSEC14* es una de las condiciones necesarias para que pueda utilizarse como diana en el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos, por lo tanto esta característica confiere gran relevancia al estudio de dicho gen.

2.1. Datos que apoyan esta afirmación.

Con el objeto de conocer la función de *CaSEC14* en *Candida albicans*, se trató de construir una estirpe mutante que careciera de la proteína codificada por dicho gen. Para ello, se procedió a la interrupción de ambos alelos de *CaSEC14*, utilizando el sistema descrito por Fonzi e Irwin (Fonzi y Irwin, 1993). En los procesos de interrupción de genes de *C. albicans* mediante este método, la frecuencia con la que el proceso de delección se lleva a cabo correctamente por recombinación homóloga frente a aquellos casos en los cuales la construcción se integra en otra región del genoma es muy variable. Esto es así, tanto en el caso del primer alelo como en el del segundo: los porcentajes de obtención de los transformantes adecuados oscilan entre un 100% y un 15% para el primer alelo y un 60% y 7% para el segundo, en los casos en que es posible obtenerlos (tabla X). Esto puede deberse, en parte, a la construcción genética utilizada para realizar la interrupción, ya que ésta puede presentar zonas homólogas al DNA genómico de tamaños muy variables. Además, la propia construcción puede tener un tamaño muy variable y, normalmente, muy diferente al de la zona de DNA homólogo que va a reemplazar.

Tabla X. Frecuencia de interrupción de los alelos de algunos genes de *C. albicans* con la construcción *hisG-CaURA3-hisG*.

Gen	1 ^{er} alelo (%)	2 ^o alelo (%)	Referencia
<i>MKC1</i>	40	20	(Navarro-García <i>et al.</i> , 1995)
<i>ARG5,6</i>	15	15	(Negredo <i>et al.</i> , 1997)
<i>XOG1</i>	60	60	(González <i>et al.</i> , 1997)
<i>BGL2</i>	33	7	(Sarchy <i>et al.</i> , 1997)
<i>CDR2</i>	100	20	(Sanglard <i>et al.</i> , 1997)
<i>ADE2</i>	80	33	(Fonzi y Irwin, 1993)
<i>CaSEC14</i>	75	0	(Monteoliva <i>et al.</i> , 1996)

En el proceso de interrupción del primer alelo de *CaSEC14*, la frecuencia de integración de la construcción en el *locus* adecuado fue de 75%, mientras que en el caso del segundo alelo no se obtuvo ningún clon en el que se hubiera eliminado el alelo parental. Según los datos expuestos en la tabla X, si *CaSEC14* fuera un gen dispensable para el crecimiento de *C. albicans*, los 60 clones analizados hubieran sido suficientes para obtener cepas doblemente interrumpidas. La incapacidad de obtener estas cepas homocigóticas con *CaSEC14* deletado indica que debe tratarse de un gen esencial.

Se han descrito casos de otros genes de *C. albicans* en los que, a pesar de no ser un gen esencial, tras dos rondas de interrupción mediante el sistema de Fonzi, por diversas razones, no se obtenían cepas nulas para ese gen. Así:

-En el proceso de interrupción del gen *CHS2* de *C. albicans*, se realizaron tres rondas consecutivas de transformación, debido a la existencia de tres alelos de dicho gen en *C. albicans* (Gow *et al.*, 1994). La existencia de tres copias del gen se detectó por la diferencia de intensidad de las bandas observadas al comprobar la interrupción del primer alelo. En el caso de *CaSEC14*, solo existen dos copias del gen, ya que en la cepa CNC20, que tiene uno de los alelos de *CaSEC14* interrumpido, no se observa diferencia entre la intensidad de las bandas del alelo silvestre y deletado (figura 21B).

-En la delección del gen *PHR1* de *C. albicans*, se utilizó el sistema de Fonzi e Irwin (Fonzi y Irwin, 1993) para la primera copia del gen, mientras que se optó por una estrategia de integración y expulsión ("pop-in/pop-out") en el caso de la segunda copia (Saporito-Irwin *et al.*, 1995). El cambio de estrategia fue debido a la falta de obtención de cepas homocigóticas cuando se utilizaba la misma construcción para ambos alelos (Fonzi, 1996). La explicación sugerida a este fenómeno se basa en diferencias alélicas existentes en el *locus PHR1* que fueron detectadas por el polimorfismo presentado para algunas enzimas de restricción. Según esto, diferencias en los extremos del DNA transformante con respecto a una de las copias genómicas del *locus* podrían dificultar la recombinación en esa copia frente a su integración en el otro alelo (el cual es igual al DNA transformante), aunque éste ya se haya interrumpido previamente (Fonzi, 1996). En el *locus CaSEC14* no se ha detectado polimorfismo, por lo cual ésta tampoco parece ser la razón de la falta de obtención de cepas con ambos alelos de dicho gen interrumpidos.

Todas las razones expuestas, unidas a que *SEC14* es un gen esencial en *S. cerevisiae*, apoyan que *CaSEC14* también es un gen esencial para la viabilidad de *C. albicans*. Además, como se comentará más adelante, las dificultades encontradas a la hora de construir un mutante termosensible en *CaSEC14* también podrían indicar que se trata de un gen con una función importante para la vida celular.

Hasta la fecha, solamente se han apuntado como posibles genes esenciales de *C. albicans*: *HSP90*, *CHS1* y *KRE6*. Estos, al igual que *CaSEC14*, se consideran esenciales debido a la imposibilidad de obtener cepas de *C. albicans* con ambos alelos de dichos genes interrumpidos (Mio *et al.*, 1996; Mio *et al.*, 1997; Swoboda *et al.*, 1995). El gen *NMT1* es esencial cuando *C. albicans* crece en ausencia de miristato. Esto se ha comprobado con la construcción de un mutante en dicho gen, el cual es auxótrofo para miristato, tanto a 24 °C como a 37 °C, y su incubación a 37 °C en ausencia de este sustrato produce muerte celular (Weinberg *et al.*, 1995).

2.2. Obtención de alelos y mutantes termosensibles.

Debido a la imposibilidad de obtener un mutante de *C. albicans* con ambos alelos de *CaSEC14* interrumpidos, se optó por la construcción de un mutante termosensible. El interés de obtener dicho mutante era triple ya que, en primer lugar, permitiría comprobar si *CaSEC14* es un gen esencial para la viabilidad de *C. albicans*, en segundo lugar, se podría estudiar el fenotipo terminal producido por la disfunción de *CaSec14p* y, en tercer lugar, hasta el momento no se ha construido ningún mutante de *C. albicans* mediante mutagénesis dirigida. Este último punto aumentaba el interés de su construcción, ya que era posible que se aportaran datos relevantes sobre los mecanismos básicos que están implicados en la termosensibilidad de proteínas y cepas de *C. albicans*, así como sobre las similitudes y diferencias existentes entre las mutaciones que pueden conferir termosensibilidad en *S. cerevisiae* y en *C. albicans*.

En primer, lugar se construyeron dos alelos mutantes denominados *Casec14-1* y *Casec14-7*. La construcción de cepas que portaran un alelo del gen *CaSEC14* interrumpido y el otro con una de estas mutaciones se llevó a cabo mediante una estrategia de integración y expulsión (figura 28). Se seleccionaron algunos clones con fenotipo termosensible y en los que tras la recuperación del alelo no interrumpido se comprobó que, sorprendentemente, no era *Casec14-1* ni *Casec14-7*. Esto fue así, incluso en el clon "2.179" donde, previamente, se había detectado mediante PCR la presencia del alelo mutante *Casec14-7*. Posibles explicaciones a estos resultados se exponen a continuación:

1) Es posible que los alelos mutantes *Casec14-1* y *Casec14-7* codifiquen proteínas que carezcan de función en *C. albicans*. Esto, aunque podría parecerlo, no está en contra de que *Casec14-1*, como se ha comprobado, sea un alelo termosensible en *S. cerevisiae*, ya que hasta el momento no se ha descrito ninguna mutación que produzca un fenotipo termosensible tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*. El único caso en el que una mutación definida, que produce un fenotipo termosensible en *S. cerevisiae*, se introdujo en el gen homólogo de *C. albicans* es el del gen *NMT1*. El mutante de *S. cerevisiae* en este gen presentaba una auxotrofia para miristato dependiente de la temperatura (auxótrofo 37 °C y no a 24 °C). Al introducir la misma mutación en el gen homólogo de *C. albicans* se construyó un mutante que resultó ser auxótrofo para miristato pero tanto a 24 °C como a 37 °C (Weinberg *et al.*, 1995).

2) Está descrito que en *C. albicans* existe una frecuencia muy elevada de recombinación (Kirsch *et al.*, 1990). Es posible que en alguna de esas recombinaciones se produzcan estirpes en las que se hayan expulsado los alelos *Casec14-1* o *Casec14-7* y que podrían tener ventajas selectivas, en las condiciones de selección y posterior manejo de los transformantes, frente a aquellas cepas que mantengan los alelos mutantes en su genoma. Esta eliminación de las mutaciones se podría producir en dos momentos:

A) Una posibilidad (figura 34A) apunta a que se produzca al forzar la recombinación y expulsión del marcador. Si esta recombinación ocurre, en todos los casos, por las zonas que producen la expulsión de la mutación termosensible (líneas rojas punteadas) no obtendríamos estirpes con los alelos mutantes en su genoma. Estas tampoco se obtendrían si, aunque la recombinación se llevara a cabo por todas las zonas posibles (líneas rojas y azules punteadas), las cepas que portaran los alelos mutados no pudieran crecer en 5-FOA.

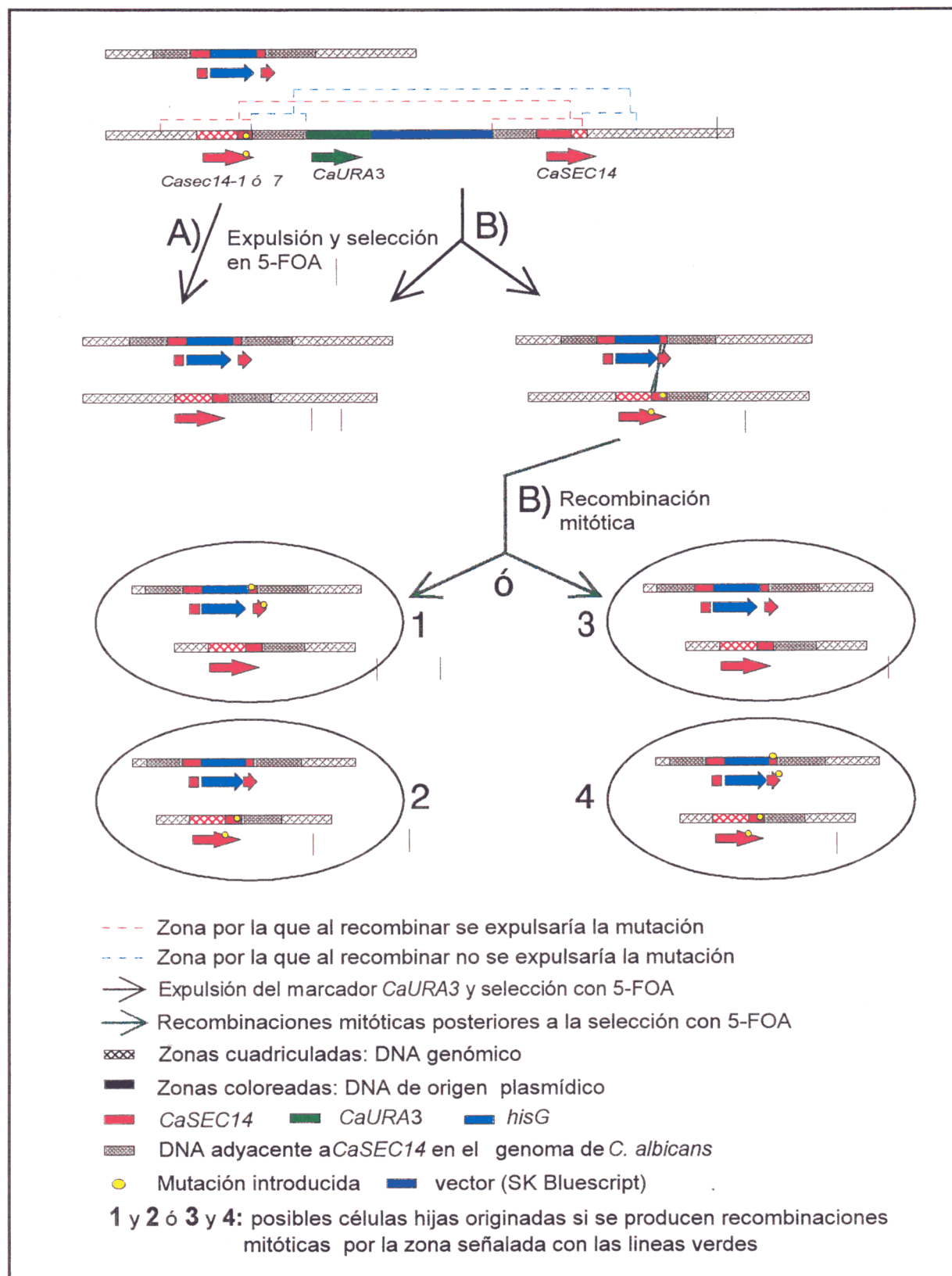


Figura 34. Posibilidades de eliminación de los alelos *Cassec14-1* o *Cassec14-7* del genoma de *C. albicans*. A) Recombinación en la que se fuerza la expulsión del marcador de selección y una copia de *CaSEC14*. (Si la recombinación se produce por la zona señalada con las líneas rojas punteadas se eliminaría el alelo mutante) B) Recombinación mitótica posterior a la selección en 5-FOA (distintas posibilidades de células hijas).

B) Otra posibilidad sería que en alguno de los clones Ura- obtenidos tras la selección en 5-FOA se encontraran, en un primer momento, los alelos termosensibles pero que éstos fueran posteriormente eliminados mediante recombinaciones posteriores (figura 34B, línea verde). Tras las posibles recombinaciones mitóticas, en parte de la progenie las mutaciones termosensibles podrían localizarse en el mismo alelo que se encuentra interrumpido (figura 34, 1), o podrían haberse eliminado del genoma dando lugar, en ese caso, a cepas idénticas a CNC21 (figura 34, 3). En cualquiera de estos casos, dichas células hijas podrían tener ventajas selectivas frente a aquellas células que continuaran portando los alelos termosensibles (figura 34, 2 ó 4).

A pesar de que en las estirpes termosensibles de *C. albicans* seleccionadas no se encuentren los alelos *Casec14-1* y *Casec14-7*, su estudio podría resultar provechoso ya que, analizando su capacidad de filamentación, se comprobó que presentaban fenotipos interesantes. Estos fenotipos incluyen patrones muy variados tanto en la morfología del cultivo (predominio de levaduras o filamentos) como en el porcentaje de lisis a 37 °C (tabla IX). De esto se concluye que hemos obtenido una colección de mutantes cuyo estudio más profundo podría aportar datos novedosos sobre procesos celulares muy relevantes en *C. albicans*, como son la transición dimórfica o los procesos relacionados con la integridad celular cuyo defecto produce lisis a 37 °C.

Es posible que existan diferencias entre las mutaciones de *S. cerevisiae* que producen fenotipos termosensibles y las que puedan producir dichos fenotipos en *C. albicans*. Debido a ello, es importante destacar que, para construir mutantes termosensibles en un gen definido de *C. albicans*, podría ser más efectivo mutagenizar dicho gen al azar y comprobar el fenotipo producido por los alelos mutantes directamente en *C. albicans* que intentar introducir en *C. albicans* las mutaciones similares a las de *S. cerevisiae*. Por último, otro factor a tener en cuenta a la hora de estudiar fenotipos termosensibles en *C. albicans* es la temperatura restrictiva. El hecho de que la temperatura óptima de crecimiento de esta levadura patógena sea de 37 °C sugiere que para comprobar la termosensibilidad en esta especie podría ser importante utilizar temperaturas más elevadas (ej. 42 °C).

2.3. Nuevas estrategias para comprobar la esencialidad de distintos genes de *C. albicans*

La aparición constante de nuevas herramientas para la manipulación genética de *C. albicans*, sugiere nuevas posibilidades para comprobar de una manera más concluyente si un gen de esta especie es esencial para su crecimiento y viabilidad celular.

Por ejemplo los **promotores regulables** que bloquean la expresión de un gen en condiciones de represión son herramientas válidas para esta comprobación. Se podría construir una cepa de *C. albicans* con un alelo del gen de estudio interrumpido y otro bajo la regulación de un promotor de este tipo. Si esta estirpe solamente creciera en condiciones de inducción nos encontraríamos ante un gen esencial. La carencia, hasta hace poco tiempo, de genes indicadores que funcionaran en *C. albicans* ha dificultado el estudio de la fuerza o regulación de los distintos promotores de los genes de esta especie. Recientemente, se han descrito algunos promotores regulables pero que mantienen un nivel de expresión incluso en condiciones de represión. Estos son los de los

genes *GAL1* (Srikantha *et al.*, 1996), *MAL2* (Brown *et al.*, 1996a), *HEX1* (Mio *et al.*, 1997) y *PCK1* (Stoldt *et al.*, 1997). Sin embargo, el promotor del gen *MRP1* (inducible por maltosa) se ha utilizado para construir un mutante de *C. albicans* con un alelo de *TOP1* interrumpido y el otro bajo el control de dicho promotor. En la cepa mutante obtenida, en condiciones de represión, no se detectó la actividad DNA topoisomerasa I codificada por *TOP1* (Jiang *et al.*, 1997). Esto parece indicar una expresión nula de dicho gen y sugiere que dicho promotor sí que puede utilizarse para comprobar qué genes son esenciales en *C. albicans*. Además, actualmente también se está estudiando la regulación de otros dos promotores de genes que intervienen en la síntesis de aminoácidos en *C. albicans* (*CaHIS4* y *CaARG5,6*) para su posible utilización en sistemas de expresión regulados en *C. albicans* (Negredo *et al.*, 1997a).

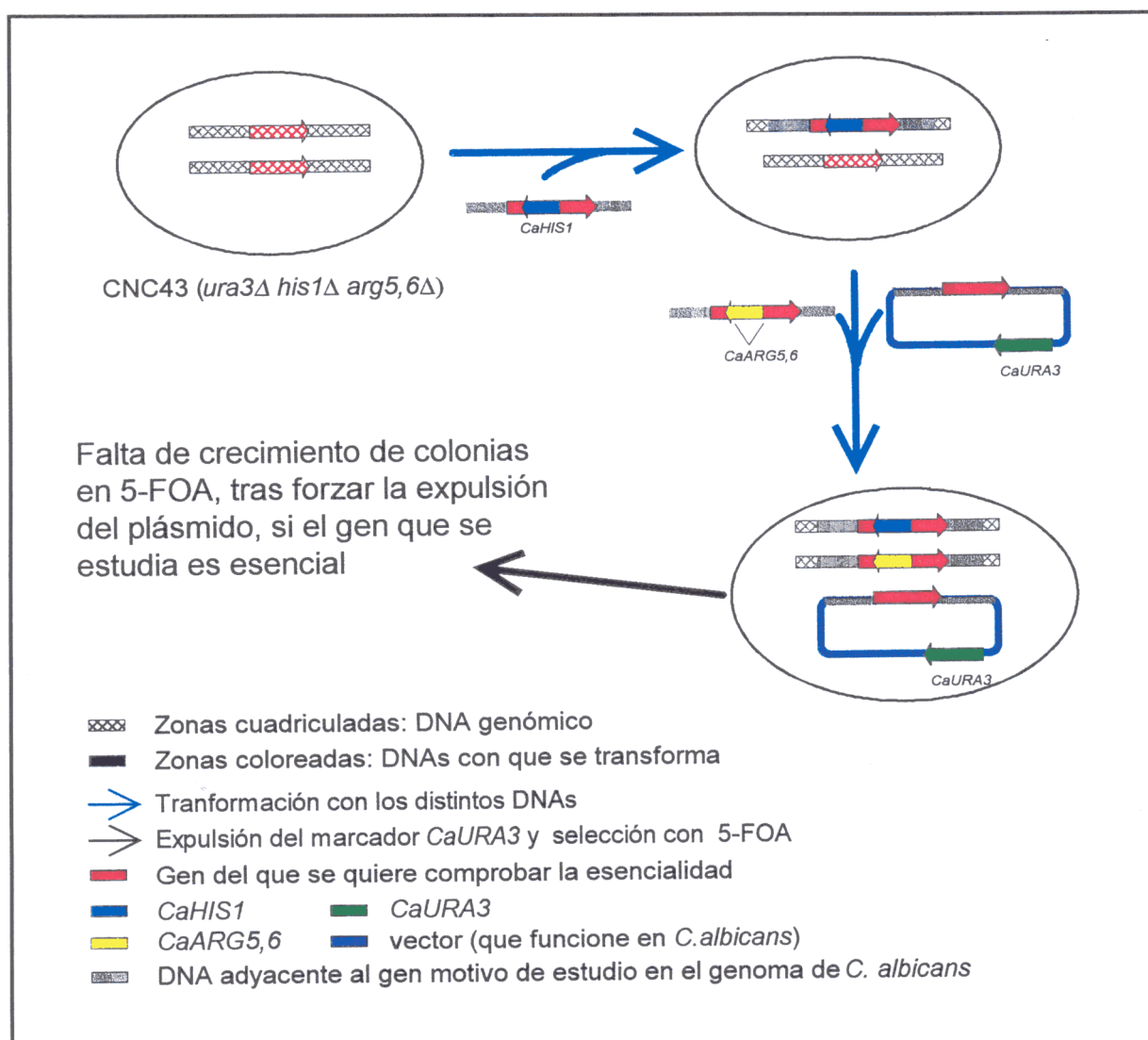


Figura 35. Utilización de la cepa CNC43 de *C. albicans* para comprobar si un determinado gen de esta especie es esencial para el crecimiento celular. Para detalles, ver el texto.

Otra estrategia factible, desde el punto de vista teórico, para comprobar si un gen es esencial en *C. albicans* consistiría en la utilización de cepas con **tres auxotrofías**. Desde hace algunos años, existen cepas de *C. albicans* que presentan varias auxotrofías, como *C. albicans* 1006 (*MPA1 ser57 ura3 lys1 arg4*) (Goshorn y Scherer, 1989) o 1161 (*MPA1 ser57 ura3 lys1 arg4 gal1*) (Goshorn *et al.*, 1992); sin embargo, estas estirpes habían sido obtenidas mediante mutagénesis, lo que implica la existencia de cierta frecuencia de reversión. Recientemente se ha descrito la construcción de *C. albicans* CNC43 (*ura3Δ his1Δ arg5,6Δ*) que al haber sido obtenida mediante interrupción de los genes correspondientes no presenta problemas de reversión (Negredo *et al.*, 1997). Debido a que los genes que complementan dichas auxotrofías también han sido clonados (Gillum *et al.*, 1984; Negredo *et al.*, 1997; Pla *et al.*, 1995), se dispone de una cepa en la que teóricamente se podría cotransformar con tres DNAs que portaran tres marcadores de selección diferentes. Esta cepa representa un herramienta muy versátil para la manipulación genética de *C. albicans* y una de sus aplicaciones podría ser comprobar la esencialidad de los genes en esta levadura. Para ello (figura 35) habría que, en primer lugar, interrumpir en esta cepa un alelo del gen de interés con uno de los genes marcadores. Después, se podría cotransformar con dos DNAs que portaran los dos marcadores de selección restantes: un DNA lineal dirigido a interrumpir el segundo alelo del gen de estudio y un plásmido que portara dicho gen y, de esta forma, complementara su carencia. Si posteriormente se forzara la pérdida del plásmido y mediante sistemas de contraselección adecuados (ej: 5-FOA) se pudieran seleccionar aquellos clones que lo hubieran perdido, éstos solamente crecerían el caso de que no se tratara de un gen esencial.

3. CaSec14p ES LA PROTEÍNA DE *C. albicans* HOMÓLOGA A Sec14p DE *S. cerevisiae*.

Los resultados obtenidos durante la realización de la presente memoria indican que la proteína CaSec14p de *C. albicans* es **homóloga** a Sec14p de *S. cerevisiae* tanto por su función como por su secuencia. Esto se apoya en los datos expuestos a continuación.

1) CaSec14p comparte un 67,8 % de identidad con Sec14p de *S. cerevisiae*. Los porcentajes de identidad que comparten distintas proteínas de *C. albicans* con sus proteínas homólogas de *S. cerevisiae* son bastante variables, algunos son superiores y otros significativamente inferiores a 67,8 % (ver tabla XI). Esto implica que la identidad presentada entre las proteínas Sec14p de ambos organismos concuerda perfectamente con la idea de que se traten de las proteínas homólogas en ellos.

2) CaSec14p complementa el fenotipo del mutante termosensible CTY1-1A de *S. cerevisiae*, cuando se encuentra codificada desde un plásmido multicopia (pLM1), así como cuando se codifica desde un plásmido centromérico (pCEN1). En estos mutantes puede existir proteína Sec14p^{ts} de *S. cerevisiae* y la proteína de *C. albicans* podría, de alguna manera, colaborar con ella en desarrollar su función a la temperatura no permisiva; pero también es posible que CaSec14p simplemente sustituya la función de la proteína termosensible de *S. cerevisiae*. Por otra parte, CaSEC14 en un plásmido multicopia también puede complementar un mutante de *S. cerevisiae* interrumpido en *SEC14*, lo cual indica claramente que la proteína CaSec14p de *C. albicans* puede sustituir a Sec14p de

S. cerevisiae en su función celular. De ello se deduce que CaSec14p podría intervenir en *S. cerevisiae* en la formación de vesículas de secreción a partir de las últimas cisternas del aparato de Golgi de igual forma que lo hace Sec14p; es decir, a través de la regulación de la síntesis de PC como se propone en el modelo del sensor (figura 7).

Tabla XI. Porcentajes de homología compartido entre proteínas de *C. albicans* y las correspondientes de *S. cerevisiae*.

Gen de <i>C. albicans</i>	Gen de <i>S. cerevisiae</i>	% de homología entre las proteínas correspondientes	Referencia
<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	85,1	(Bertram <i>et al.</i> , 1996)
<i>CPH1</i>	<i>STE12</i>	74	(Liu <i>et al.</i> , 1994)
<i>MKC1</i>	<i>SLT2</i>	55	(Navarro-García <i>et al.</i> , 1995)
<i>SEC18</i>	<i>SEC18</i>	50	(Nieto <i>et al.</i> , 1993).
<i>PDE1</i>	<i>PDE1</i>	44	(Hoyer <i>et al.</i> , 1994)
<i>SEC14</i>	<i>SEC14</i>	67	(Monteoliva <i>et al.</i> , 1996)

Aunque, debido a la falta de un mutante de *C. albicans* en *CaSEC14*, no podemos saber su función real en esta levadura patógena, podemos suponer que CaSec14p podría intervenir, también en *C. albicans*, en la formación de vesículas de secreción a partir del aparato de Golgi tardío. Sin embargo, en *C. albicans* existe otra proteína que está relacionada con la función de Sec14p en *S. cerevisiae* y parece no ser homóloga a ninguna proteína de *S. cerevisiae*. Dicha proteína está codificada por un gen que, en multicopia, suprime el fenotipo termosensible del mutante de *S. cerevisiae* CTY1-1A. Distintos plásmidos, pLM13, pLM15 y pLM19, clonados en el rastreo del mutante (resultados, punto 1.3) portan este gen. Se ha secuenciado un fragmento importante (aproximadamente 2 kb) de dicho gen supresor y no se ha encontrado ninguna homología suficientemente significativa con las secuencias depositadas en las bases de datos (entre ellas el genoma completo de *S. cerevisiae*)(resultados no mostrados). Esta proteína podría estar relacionada también con la función de CaSec14p en *C. albicans* y su estudio más profundo podría aportar datos novedosos sobre la función de CaSec14p en la propia *C. albicans*.

CaSec14p y/o su relación con otras proteínas es ligeramente diferente en *C. albicans* y en *S. cerevisiae*, ya que CaSec14p presenta una movilidad electroforética menor cuando se detecta en *C. albicans* que cuando es detectada en *S. cerevisiae* (figura 31). Esto podría deberse a diferentes razones:

A) Por ejemplo, CaSec14p podría sufrir algún tipo de modificación post-traducciona, tal como glucosilación, que afecte notablemente al tamaño de la proteína. Sin embargo, este proceso tendría lugar en *C. albicans* pero no en *S. cerevisiae*, ya que cuando se detecta en esta última levadura su movilidad es la esperada. Por lo tanto, en caso de que se produjera algún proceso de este tipo, éste se regularía mediante señales distintas en *C. albicans* y en *S. cerevisiae*.

B) Otra posible explicación, no mutuamente excluyente con la anterior, sería que CaSec14p se encontrara unida covalentemente a otra proteína, de forma que no se disociara en las condiciones desnaturizantes del gel de poliácridamida utilizado. No es probable, por el tamaño de la banda detectada, que CaSec14p se

encuentre asociada a sí misma formando un dímero; sin embargo, es posible que se encuentre asociada a otra proteína diferente. En ese caso, es posible que la nueva proteína se tratara de la enzima colinafosfato citidililtransferasa, sugiriendo un mecanismo de acción similar al de Sec14p de *S. cerevisiae*, o de cualquier otra proteína de *C. albicans*, en cuyo caso, su estudio podría ser de elevado interés.

4. LAS PITPs HUMANAS CUMPLEN LA FUNCIÓN DE Sec14p EN *S. cerevisiae*.

El hecho de que *CaSEC14* se trate de un gen esencial, convierte a Sec14p en una candidata adecuada para ser utilizada en la búsqueda de nuevos fármacos antifúngicos. Debido a que una de las características más deseables en todo antifúngico es presentar selectividad por su diana en la célula fúngica frente a las proteínas homólogas humanas y evitar así problemas de toxicidad, se procedió a estudiar las posibles homologías entre proteínas humanas y Sec14p.

Se considera que las proteínas de transferencia de fosfatidilinositol de mamíferos, a pesar de no presentar una secuencia similar a Sec14p, realizan en las células de eucariotas superiores la misma función que Sec14p en levaduras. Esto se apoya, como ya se ha comentado en la introducción, en que además de presentar la misma actividad bioquímica *in vitro* (Aitken *et al.*, 1990) y una masa molecular muy parecida, tanto Sec14p puede sustituir a las PITPs de mamíferos en todas las funciones en que han sido implicadas (ver figura 8) (Cunningham *et al.*, 1996; Hay y Martin, 1993; Ohashi *et al.*, 1995), como ambas isoformas de la PITP de rata son capaces de complementar, en un plásmido multicopia, los defectos de crecimiento y secreción de un mutante de levadura *sec14^{ts}*. (Skinner *et al.*, 1993; Tanaka y Hosaka, 1994).

Para la posterior aplicación de CaSec14p como diana en la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos puede resultar muy beneficioso que las proteínas humanas que realizan su misma función no tengan una secuencia similar. Esta diferente secuencia refleja que entre ambas proteínas existirán diferencias que facilitarán la consecución de fármacos que inhiban selectivamente la proteína fúngica. Como los datos existentes sobre la capacidad de la PITPs de mamífero de complementar mutantes de levadura se referían a proteínas de rata, parecía interesante realizar estudios de complementación con las proteínas humanas.

Para ello, los genes que codifican ambas isoformas de las PITPs humanas fueron amplificados y subclonados en un vector episómico bajo el control del promotor GAL1. Con estas construcciones se estudió la capacidad de las proteínas humanas de complementar mutantes *sec14* de levadura.

Se comprobó que ambas isoformas de la PITP humana, tanto la α como la β , pueden complementar los defectos de crecimiento mutante termosensible de *S. cerevisiae* CTY1-1A (figura 33). Este resultado concuerda con los descritos por otros autores para las isoformas de la PITP de rata.

Además, también se comprobó que ambas isoformas de las PITPs humanas complementan la falta de crecimiento de un mutante de *S. cerevisiae* con el gen *SEC14*

delecionado. Este dato es de gran relevancia, ya que implica que estas proteínas son capaces de sustituir la función de Sec14p en *S. cerevisiae*.

Los datos de Skinner y col. (Skinner *et al.*, 1993) son aparentemente contradictorios con esta afirmación, ya que estos autores describieron que la PITP α de rata no era capaz de complementar un mutante de levadura interrumpido en el gen *SEC14*. Para comprobarlo realizaron construcciones genéticas en las que el cDNA del gen estructural de PITP α se situó bajo el control del promotor de *SEC14*. Dichas construcciones, en un plásmido multicopia, complementan a un mutante *sec14* termosensible pero no a un mutante con el gen *SEC14* delecionado. La explicación sugerida por estos autores a esta falta de complementación era la reducida afinidad que PITP α de rata presenta por las membranas de Golgi con respecto a Sec14p.

Dado que las isoformas α de las PITPs humana y de rata únicamente presentan tres aminoácidos diferentes a lo largo de toda la proteína (bastante separados entre sí), no parece probable que dichas proteínas sean lo suficientemente distintas para que exista esa diferencia en la capacidad de complementación. Parece más coherente la idea de que los distintos promotores bajo los que se regula la expresión de estas proteínas puedan producir resultados diferentes. La proteína de rata se encuentra bajo el control del promotor de *SEC14* que es constitutivo y la humana bajo el control del promotor inducible de *GAL1*. Esto implica que, en condiciones de inducción, podría haber un exceso de proteína humana que no existiría en el caso de la de rata y podría deslocalizarse en los alrededores del aparato de Golgi realizando así la función de Sec14p.

Para comprobar esta hipótesis habría que hacer estudios de complementación con otras construcciones de la proteína humana con menores niveles de expresión, así como estudios de localización las PITP α de rata y humana cuando se expresan desde distintas construcciones.

Todos estos datos no excluyen el modelo propuesto por de Vries y col. y comentado anteriormente según el cual la isoforma PITP β realizaría las mismas funciones que Sec14p *in vivo*, mientras que la isoforma PITP α estaría implicada en otro tipo de funciones celulares (De Vries *et al.*, 1995).

El descubrimiento de la capacidad de ambas isoformas de las PITPs humanas de complementar mutantes de *S. cerevisiae* interrumpidos en el gen *SEC14* es de gran relevancia, ya que, hasta la fecha, no existía ningún dato sobre la complementación de mutantes *sec14* interrumpidos por parte de la PITP β de mamíferos y los datos que había sobre la isoforma α indicaban falta de complementación. Aquí, por el contrario se aportan datos que indican la capacidad de ambas isoformas de sustituir la función de Sec14p en la levadura y, por lo tanto, apoyan la idea de que las proteínas de transferencia de fosfatidilinositol de mamíferos son las homólogas funcionales de Sec14p en dichos organismos.

Recientemente, se ha descrito la secuencia de un gen humano al que se ha denominado *SEC14L* por compartir cierta homología en una zona de su secuencia con *SEC14* de *S. cerevisiae* (Chinen *et al.*, 1996). No se conocen datos a cerca de la función de Sec14Lp. La comprobación de que *SEC14L* comparte mayor homología con las secuencias de otros genes de otras especies (ORF *YNO2* de *C. elegans* y el gen que codifica la proteína de unión a retinal de "Japanese flying squid" o *Todarodes pacificus*, proteína que une ligandos hidrofóbicos) que con *SEC14* de levadura, podría sugerir que la función de Sec14Lp esté relacionada con la unión de algún tipo de ligandos hidrofóbicos. De esto se deduce que la función de Sec14Lp puede no tener ninguna relación con la función de Sec14p, lo que

concordaría con que la P1TP es la proteína que realiza la misma función en células humanas que Sec14p en levaduras.

5. CaSec14p COMO DIANA PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS Y SELECTIVOS AGENTES ANTIFÚNGICOS.

Todo lo expuesto hasta el momento indica que CaSec14p cumple muchos de los requisitos deseables para considerarla como una buena diana que podría ser utilizada en la búsqueda de nuevos fármacos con actividad antifúngica. Esto supone un interés añadido a este trabajo ya que tiene, además del interés puramente básico del estudio de este gen, una posible aplicación en la búsqueda de soluciones terapéuticas para el problema de las candidiasis. Las características que presenta CaSec14p y la convierten en una buena candidata para ser utilizada como diana son:

1) *CaSEC14* es un **gen esencial** para el crecimiento de la levadura.

2) Se encuentra en un número importante de especies de levadura: *S. cerevisiae* (Bankaitis *et al.*, 1989), *K. lactis* (Salama *et al.*, 1990), *S. pombe* (Bankaitis *et al.*, 1989), *Y. lipolytica* (Lopez *et al.*, 1994) y *C. glabrata* (EMBL data library). Además, las proteínas Sec14p de todas estas especies presentan un porcentaje bastante elevado de identidad. Todo ello, sugiere un **elevado grado de conservación** entre estas proteínas de las distintas especies de **eucariotas inferiores**. Gracias a esta conservación parece posible, utilizando Sec14p como diana, encontrar antifúngicos con un amplio espectro de acción.

3) Tiene una supuesta actividad bioquímica (transferencia de fosfatidilinositol y fosfatidilcolina entre membranas lipídicas) que podría medirse mediante un **ensayo bioquímico *in vitro*** (Aitken *et al.*, 1990). Esto permitiría ensayar *in vitro* la mayor o menor potencia de inhibición, de dicha actividad bioquímica, presentada por la distintas sustancias ensayadas en la búsqueda del mencionado antifúngico.

4) Las secuencias de las **proteínas humanas** que realizan funciones similares a las de Sec14p, **P1TP α** y **P1TP β** , no comparten ninguna homología con su secuencia de aminoácidos. Este dato es de elevada importancia, ya que permite suponer que podría ser relativamente sencillo encontrar sustancias que **inhiban selectivamente** la proteína del hongo y no las humanas, evitando así futuros problemas de toxicidad del medicamento.

5) Las proteínas humanas **P1TP α** y **P1TP β** complementan mutantes de *S. cerevisiae* interrumpidos en el gen *SEC14*. Esta capacidad representa otra ventaja a la hora de diseñar búsquedas de sustancias que inhiban selectivamente la proteína fúngica frente a la humana, ya que permite diseñar numerosos **sistemas de búsqueda de sustancias antifúngicas selectivas *in vivo***. Los ensayos *in vivo* se realizarían directamente sobre levaduras y permitirían detectar la selectividad de dichas sustancias para bloquear la función de la proteína de levadura y no de la humana. Estos ensayos conviene que sean lo mas sencillos posible y que se realicen en placas multipocillo, de manera que sea factible probar cantidades muy pequeñas de un número muy elevado de sustancias. Dos ensayos de este tipo, en los que las cepas adecuadas de levadura se siembran en placas multipocillo, se inocula una sustancia a ensayar en cada uno de los pocillos de la placa y después de la incubación según el crecimiento de las levaduras u

otra característica de ellas podemos conocer la selectividad del compuesto ensayado, se describen a continuación:

A) En uno de estos ensayos, se podría comprobar la actividad inhibitoria de los diferentes compuestos frente a una única estirpe de levadura *sec14Δ* en la que se exprese tanto la proteína de levadura como una de las isoformas de la PITP humana. Para poder detectar la inhibición diferencial de estas dos proteínas por parte del antifúngico, la PITP humana se podría regular bajo el control del promotor GAL1 (figura 36A) mientras Sec14p portaría su propio promotor. Así, Sec14p no se encontraría regulado por las fuentes de carbono sino que su expresión sería constitutiva, mientras que PITPβ solo se expresaría con galactosa. En este caso, habría que comprobar la capacidad de crecimiento de la cepa en estudio frente a las distintas sustancias utilizando tanto glucosa como galactosa como fuentes de carbono. En aquellos pocillos en que la cepa creciera únicamente con galactosa, estaríamos frente a un compuesto con la selectividad buscada. Una estirpe con plásmidos que expresen ambas proteínas se construyó durante la realización de este trabajo (SSC03, punto 3.2.2. de los resultados), pero se podrían construir otras cepas para optimizar un ensayo de este tipo: por ejemplo se podrían integrar las construcciones de expresión de las proteínas Sec14p y PITPβ en el genoma o se podría expresar CaSec14p en lugar de Sec14p.

B) En otro ensayo de este tipo, se podrían utilizar dos mutantes de *S. cerevisiae* con el gen *SEC14* delecionado que pudieran sobrevivir gracias a la complementación de la función anulada desde un plásmido que porten. En uno de los mutantes el plásmido debería expresar Sec14p de levadura y en el otro una PITP humana (figura 36B). Si estos mutantes tuvieran el fondo genético y los plásmidos adecuados, uno de ellos podría presentar colonias de color rojo mientras que las del otro serían blancas. Esta variación de color se podría aprovechar para diferenciar fácilmente el crecimiento de ambas cepas y permitiría inocular ambas cepas juntas en cada uno de los pocillos de la placa. Esto representa una ventaja respecto al ensayo anterior porque la utilización de una única placa multipocillo supone ahorro de trabajo y, sobre todo, de las sustancias a ensayar. Sin embargo, el utilizar dos cepas distintas podría representar una desventaja respecto al método anterior si éstas no presentaran igual velocidad de crecimiento, ya que esto podría falsear los resultados. Después de la inoculación de la placa multipocillo con las distintas sustancias y de la incubación adecuada, se detectaría el crecimiento de las cepas simplemente por diferencias de color. En aquellos pocillos en los que no se observe color rojo y si blanco se encontrarían las sustancias que nos interesan, ya que se habría bloqueado la función de la proteína de la levadura y no la humana. Algunas cepas adecuadas para realizar este ensayo ya están construidas. Así la estirpe CTY588 (*sec14Δ1::HIS3/pCTY11*), en la que el plásmido porta el gen *SEC14* de *S. cerevisiae*, es de color rojo cuando crece en condiciones limitantes de adenina, mientras que las estirpes SSC12 (*sec14Δ1::HIS3/pYPIα*) o SSC13 (*sec14Δ1::HIS3/pYPIβ*) en las que los plásmidos llevan las proteínas humanas, forman colonias de color blanco (figura 36B). También, para realizar el ensayo directamente sobre la proteína de *C. albicans*, se podría sustituir en CTY588 el gen *SEC14* por su homólogo de *C. albicans*.

Como estos ensayos, se pueden diseñar muchos otros (con distintos promotores regulables, distintos genes indicadores, etc.) con los que se facilite la búsqueda de inhibidores selectivos del crecimiento del hongo. De esta manera, podrían encontrarse algunas sustancias para utilizar como compuestos “cabeza de serie” y de su optimización para uso clínico podría surgir un fármaco con buenas características para tratar el problema clínico que representan las candidiasis.

De todos los datos expuestos a lo largo de la presente memoria se puede concluir que, además de haber estudiado las características intrínsecas del gen *SEC14* de *C. albicans* y la proteína que codifica, se ha comprobado que dichas características lo convierten en un candidato adecuado para explorar su posible utilización como diana en el desarrollo de nuevos y selectivos agentes antifúngicos. Estos fármacos podrían colaborar en la erradicación del problema clínico que actualmente supone la candidiasis o, incluso, podrían ser utilizados para el tratamiento de otras infecciones fúngicas que cada día están adquiriendo mayor relevancia.

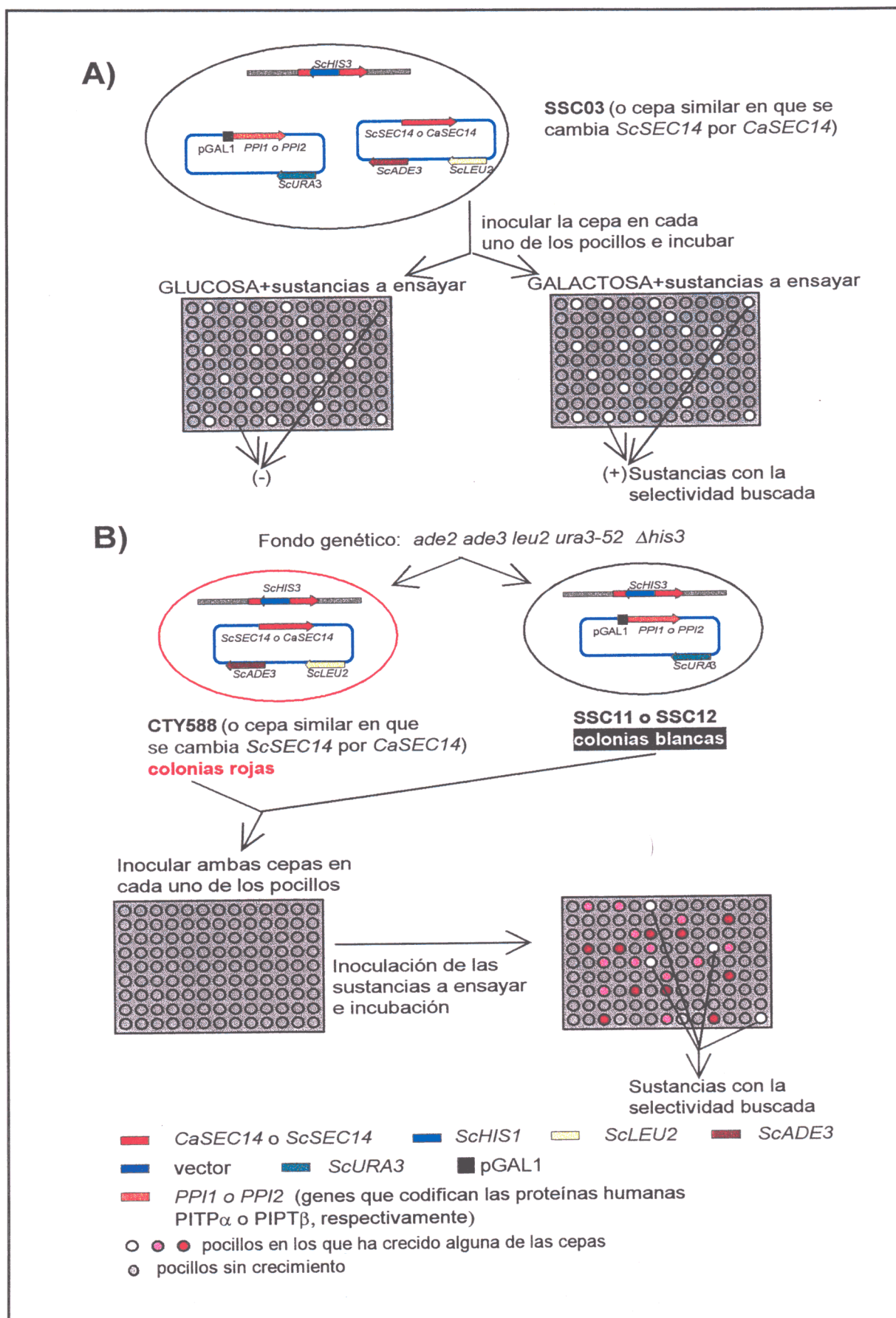


Figura 36. Ejemplos de sistemas *in vivo* de búsqueda de fármacos antifúngicos con la selectividad adecuada. Para detalles, ver el texto.

CONCLUSIONES

1. La clonación del gen *CaSEC14* de *C. albicans*, mediante complementación funcional del fenotipo termosensible de un mutante *sec14^{ts}* de *S. cerevisiae*, permitió comprobar que dicho gen de *C. albicans* es el homólogo funcional de *SEC14* de *S. cerevisiae*.

2. *CaSec14p* es una proteína de 301 aminoácidos que comparte un 67% de identidad con *Sec14p* de *S. cerevisiae*, así como porcentajes similares con los genes homólogos de otras levaduras relacionadas. Por tanto, la proteína *Sec14p* de *C. albicans* es homóloga estructural de *SEC14* de *S. cerevisiae*.

3. *CaSEC14* es un gen esencial para el crecimiento y viabilidad de *C. albicans*, ya que no es posible obtener cepas de este organismo delecionadas en ambos alelos de dicho gen.

4. La detección de *CaSec14p* con anticuerpos frente a la proteína *Sec14p* de *S. cerevisiae* demuestra que dicha proteína presenta menor movilidad electroforética cuando es expresada en *C. albicans* que cuando se expresa en *S. cerevisiae*. Esto puede ser debido a diferencias en la maduración o en la asociación con otras proteínas.

5. El alelo mutante del gen *SEC14* de *C. albicans* *sec14-1*, obtenido mediante PCR, se comporta como un alelo termosensible cuando se expresa en *S. cerevisiae*.

6. Las isoformas α y β de la proteína humana de transferencia de fosfatidilinositol y fosfatidilcolina (PITP) son capaces de complementar el fenotipo termosensible de mutantes *sec14^{ts}* de *S. cerevisiae* y de sustituir la función de *Sec14p* en estirpes de *S. cerevisiae* con el gen *SEC14* delecionado, a pesar de no existir homología entre la secuencia de dichas proteínas y *Sec14p* de levaduras. Por lo tanto, ambas isoformas de la PITP humana son homólogas funcionales a las proteínas *Sec14p* de levaduras.

7. *CaSec14p* presenta algunas de las características deseables para ser utilizada como diana en la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas efectivas que no presenten problemas de toxicidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, J. F., van Heusden, G. P. H., Temkin, M. y Dowhan, W. 1990. The gene encoding the phosphatidylinositol transfer protein is essential for cell growth. *J. Biol. Chem.* **265**: 4711-4717.
- Alani, E., Cao, L. y Kleckner, N. 1987. A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of a multiply disrupted yeast strains. *Genetics* **116**: 541-545.
- Alb, J. G., Gedvilaite, A., Cartee, R. T., Skinner, H. B. y Bankaitis, V. A. 1995. Mutant rat phosphatidylinositol/ phosphatidylcholine transfer proteins specifically defective in phosphatidylinositol transfer: implications for the regulation of phospholipid transfer activity. *Proc. Natl. Acad. USA* **92**: 8826-8830.
- Alb, J. G., Kearns, M. A. y Bankaitis, V. A. 1996. Phospholipid metabolism and membrane dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 534-541.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1994a. Vesicular traffic in the secretory and endocytic pathways. En *Molecular biology of the cell*. 3ª ed. Garland Publishing, Inc. New York and London. Cap.13, pp: 599-652.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1994. Intracellular compartments and sorting. En *Molecular biology of the cell*. 3ª ed. Garland publishing, Inc. New York and London. Cap.12, pp: 551-599.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1994b. Cell signaling. En *Molecular biology of the cell*. 3ª ed. Garland Publishing, Inc. New York and London. Cap.15, pp: 721-787.
- Arita, M., Sato, Y., Miyata, A., Tanabe, T., Takahashi, E., Kayden, H. J., Arai, H. y Inoue, K. 1995. Human α -tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. *Biochem. J.* **306**: 437-443.
- Asakura, K., Iwaguchi, S.-I., Homma, M., Sukai, T., Higashide, K. y Tanaka, K. 1991. Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2531-2538.
- Ashburner, B. P. y Lopes, J. M. 1995. Regulation of yeast phospholipid biosynthetic gene expression in response to inositol involves two superimposed mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9722-9726.
- Ausubel, F. M., Kingston, R. E., Brent, R., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. 1993. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
- Bailey, D. A., Feldmann, P. J. F., Bovey, M., Gow, N. A. R. y Brown, A. J. P. 1996. The *Candida albicans* *HYR1* gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J. Bacteriol.* **178**: 5353-5360.
- Banfield, D. K., Lewis, M. J. y Pelham, H. R. B. 1995. A SNARE-like protein required for traffic through the Golgi complex. *Nature* **375**: 806-809.
- Bankaitis, V. A., Aitken, J. R., Cleves, A. E. y Dowhan, W. 1990. An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast. *Nature* **347**: 561-562.
- Bankaitis, V. A., Malehorn, D. E., Emr, S. D. y Greene, R. 1989. The *Saccharomyces cerevisiae* *SEC14* gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J. Cell Biol.* **108**: 1271-1281.
- Barlowe, C. y Schekman, R. 1993. *SEC12* encodes a guanine-nucleotide exchange factor essential for transport vesicle from ER. *Nature* **365**: 347-349.
- Beck-Sagué, C. M., Jarvis, W. R. y National Nosocomial Infections Surveillance System. 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J. Infect. Dis.* **167**: 1247-1251.
- Becker, D. M. y Guarente, L. 1991. Transformation of yeast by electroporation. *Meth. Enzymol.* **194**: 182-187.
- Becker, D. M. y Guarente, L. 1992. Protocol for high-efficiency yeast transformation. En *Guide for electroporation and electrofusion*. Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A. y Sowers, A. E. (eds.), Academic Press, Inc. San Diego, California. pp: 501-506.
- Becker, J. M., Henry, L. K., Jiang, W. y Koltin, Y. 1995. Reduced virulence of *Candida albicans* mutants affected in multidrug resistance. *Infect. Immun.* **63**: 4515-4518.

- Benli, M., Döring, F., Robinson, D. G., Yang, X. y Gallwitz, D. 1996. Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast. *EMBO J.* **15**: 6460-6475.
- Bennett, M. K. 1995. SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 581-586.
- Bennett, M. K. y Scheller, R. H. 1993. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2559-2563.
- Ben-Yaacov, R., Knoller, S., Caldwell, G. A., Becker, J. M. y Koltin, Y. 1994. *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 648-652.
- Berridge, M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **347**: 315-325.
- Bertram, G., Swoboda, R. K., Gooday, G. W., Gow, N. A. R. y Brown, A. J. P. 1996. Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. *Yeast* **12**: 115-127.
- Birse, C. E., Irwin, M. Y., Fonzi, W. A. y Sypherd, P. S. 1993. Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **61**: 3648-3655.
- Bodey, G. P. y Fainstein, V. 1985. Systemic candidiasis. En *Candidiasis*. Raven Press, New York. pp: 135.
- Brajtburg, J. y Bolard, J. 1996. Carrier effects on biological activity of Amphotericin B. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 512-531.
- Brennwald, P., Kearns, K., Champion, K., Keranen, S., Bankaitis, V y Novick, P. 1994. Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* **79**: 245-258.
- Brodsky, J. L., Goeckeler, J. y Schekman, R. 1995. BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into yeast endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9643-9646.
- Brown, A. J. P. 1996. Morphogenesis: dimorphism. *Simposio internacional: "Biología molecular, celular y patogénesis de Candida albicans"*, Valencia, España.
- Brown, D. H., Slobodkin, I. V. y Kumamoto, C. A. 1996a. Stable transformation and regulated expression of and inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration. *Mol. Gen. Genet.* **251**: 75-80.
- Brown, H. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C. y Sternweis, P. C. 1993. ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**: 1137-1144.
- Bryant, N. J. y Stevens, T. H. 1997. Two separate signals act independently to localize a yeast late Golgi membrane protein through a combination of retrieval and retention. *J. Cell Biol.* **136**: 287-297.
- Calderone, R. A. 1993. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends Microbiol.* **1**: 55-58.
- Calderone, R. A., Lineham, L., Wadsworth, E. y Sandberg, A. L. 1988. Identification of Cd3 receptors of *candida albicans*. *Infect. Immun.* **56**: 252-258.
- Calderone, R. A. y Sturtevant, J. 1996. Adhesins of *Candida albicans*. *Simposio internacional: "Biología molecular, celular y patogénesis de Candida albicans"*, Fundación Ramón Areces, Valencia, España.
- Cannon, R. D., Jenkinson, H. F. y Shepherd, M. G. 1990. Isolation and nucleotide sequence of an autonomously replicating sequence (ARS) element functional in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 210-218.
- Cannon, R. D., Jenkinson, H. F. y Shepherd, M. G. 1992. Cloning and expression of *Candida albicans* ADE2 and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 453-457.
- Cannon, R. D., Niimi, K., Jenkinson, H. F. y Shepherd, M. G. 1994a. Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* beta-N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene. *J. Bacteriol.* **176**: 2640-2647.
- Cannon, R. D., Timberlake, W. E., Gow, N. A. R., Bailey, D. A., Brown, A. J. P., Gooday, G. W., Hube, B., Monod, M., Nombela, C., Navarro, F., Pérez, R., Sanchez, M. y Pla, J. 1994. Molecular biological and biochemical aspects of fungal dimorphism. *J. Med. Vet. Mycol.* **3**: 53-64.

- Carpenter, C. L. y Cantley, L. C. 1990. Phosphoinositide kinases. *Biochemistry* **29**: 11147-11156.
- Casanova, M., Gil, L., Cardeñoso, L., Martínez, J. P. y Sentandreu, R. 1989. Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **57**: 262-271.
- Cid, V. J., Alvarez, A. M., Santos, A. I., Nombela, C. y Sánchez, M. 1994. Yeast exo-beta-glucanases can be used as efficient and readily detectable reporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 747-756.
- Clark, K. L., Feldmann, P. J. F., Dignard, D., Larocque, R., Brown, A. J. P., Lee, M. G., Thomas, D. Y. y Whiteway, M. 1995. Constitutive activation of the *Saccharomyces cerevisiae* mating response pathway by a MAP kinase kinase from *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.* **24**: 609-621.
- Cleary, T. G. 1985. Chronic mucocutaneous candidiasis. En *Candidiasis*. Raven Press, New York. pp: 241.
- Cleves, A. E., McGee, T. P. y Bankaitis, V. A. 1991a. Phospholipid transfer proteins: a biological debut. *Trends Cell Biol.* **1**: 30-34.
- Cleves, A. E., McGee, T. P., Whitters, E. A., Champion, K. M., Aitken, J. R., Dowhan, W. y Bankaitis, V. A. 1989. Mutations in the *SAC1* gene suppress defects in yeast Golgi and yeast actin function. *J. Cell Biol.* **109**: 2939-2950.
- Cleves, A. E., McGee, T. P., Whitters, E. A., Champion, K. M., Aitken, J. R., Dowhan, W., Goebel, M. y Bankaitis, V. A. 1991. Mutations in the CDP-choline pathway for phospholipid biosynthesis bypass the requirement for an essential phospholipid transfer protein. *Cell* **64**: 789-800.
- Cockcroft, S. y Thomas, G. M. H. 1992. Inositol lipid specific phospholipase C isozymes and their differential regulation by receptors. *Biochem. J.* **288**: 1-14.
- Cockcroft, S., Thomas, G. M. H., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N. F., Truong, O. y Hsuan, J. J. 1994. Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* **263**: 523-526.
- Colthurst, D. R., Santos, M., Grant, C. M. y Tuite, M. F. 1991. *Candida albicans* and three other *Candida* species contain an elongation factor structurally and functionally analogous to elongation factor 3. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**: 45-50.
- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A. R., Falkow, S. y Brown, A. J. P. 1997. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiol.* **143**: 303-311.
- Crabb, J. W., Goldflam, S., Harris, S. E. y Saari, J. C. 1988. Cloning of the cDNAs encoding the cellular retinaldehyde-binding protein from bovine and human retina and comparison of the protein structures. *J. Biol. Chem.* **263**: 18688-18692.
- Culter, J. E. 1991. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 187-217.
- Cunningham, E., Tan, S. K., Swigart, P., Hsuan, J., Bankaitis, V. A. y Cockcroft, S. 1996. The yeast and mammalian isoforms of phosphatidylinositol transfer protein can all restore phospholipase C-mediated inositol lipid signaling in cytosol-depleted RBL-2H3 and HL60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6589-6593.
- Cunningham, E., Thomas, G. M. H., Ball, A., Hiles, I. y Cockcroft, S. 1995. Phosphatidylinositol transfer protein dictates the rate of inositol triphosphate production by promoting the synthesis of PIP₂. *Curr. Biol.* **5**: 775-783.
- Cvrcková, F. y Nasmyth, K. 1993. Yeast G₁ cyclins *CLN1* and *CLN2* and a GAP-like protein have a role in bud formation. *EMBO J.* **12**: 5277-5286.
- Chinen, K., Takahashi, E. y Nakamura, Y. 1996. Isolation and mapping of a human gene (*SEC14L*), partially homologous to yeast *SEC14*, that contains a variable number of tandem repeats (VNTR) site in its 3' untranslated region. *Cytogenet. Cell Genet.* **73**: 218-223.
- Chu, W.-S., Magee, B. B. y Magee, P. T. 1993. Construction of an *Sfi*I macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J. Bacteriol.* **175**: 6637-6651.
- De Camilli, P., Erm, S. D., McPherson, P. S. y Novick, P. 1996. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* **271**: 1533-1539.
- de la Rosa, J. M., Rodríguez, L. y Ruiz, T. 1996. Clonación y caracterización de un fragmento de DNA genómico de *Candida albicans* capaz de complementar el fenotipo termosensible de los mutantes *sec61* de *Saccharomyces cerevisiae*. III Congreso Nacional de Micología, Peñíscola, España.

- De Vries, K. J., Heinrichs, A. A. J., Cunningham, E., Brunink, F., Westerman, J., Somerharju, P. J., Cockcroft, S., Wirtz, K. W. A. y Snoek, G. T. 1995. An isoform of the phosphatidylinositol-transfer protein transfers sphingomyelin and is associated with the Golgi system. *Biochem. J.* **310**: 643-649.
- Debono, M. y Gordee, R. S. 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 471-497.
- Denich, K. T., Malloy, P. J. y Feldman, D. 1992. Cloning and characterization of the gene encoding the ADP-ribosylation factor in *Candida albicans*. *Gene* **110**: 123-128.
- Dickenson, S. K., Helmkamp, G. M., Jr. y Yarbrough, L. R. 1994. Sequence of a human cDNA encoding phosphatidylinositol transfer protein and occurrence of a related sequence in widely divergent eukaryotes. *Gene* **142**: 301-305.
- Dickenson, S. K., Lim, C. N., Schuyler, G. T., Dalton, T. P., Helmkamp, G. M., Jr. y Yarbrough, L. R. 1989. Isolation and sequence of cDNA clones encoding rat phosphatidylinositol transfer protein. *J. Biol. Chem.* **264**: 16557-16564.
- Díez-Orejas, R., Molero, G., Navarro-García, F., Pla, J., Nombela, C. y Sanchez, M. 1997. Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect. Immun.* **65**:
- Dohmen, R. J., Strasser, A. W. M., Höner, C. B. y Hollenberg, C. P. 1991. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**: 691-692.
- Domínguez, A. 1996. Poliaminas y dimorfismo: clonación del gen que codifica para la ornitina descarboxilasa en *Candida albicans*. *Simposio internacional: "Biología molecular, celular y patogénesis de Candida albicans"*, Valencia, España.
- Dower, W. J., Miller, J. F. y Ragsdale, C. W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6143.
- Dowhan, W. 1991. Phospholipid-transfer proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**: 621-625.
- Edwards, J. E. 1991. Invasive *Candida* infections. Evolution of a fungal pathogen. *New Engl. J. Med.* **324**: 1060-1062.
- Erlich, H. A. 1989. *PCR technology. Principles and applications for DNA amplification*. MacMillan Publishers LTD, Basingstoke, England.
- Espenshade, P., Gimeno, R. E., Holzmacher, E., Teung, P. y Kaiser, C. A. 1995. Yeast SEC16 gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec23p. *J. Cell Biol.* **131**: 311-324.
- Fang, M., Kearns, B. G., Gedvilaite, A., Kagiwada, S., Kearns, M., Fung, M. K. Y. y Bankaitis, V. A. 1996. Kes1p shares homology with human oxysterol binding protein and participates in a novel regulatory pathway for the yeast Golgi-derived transport vesicle biogenesis. *EMBO J.* **15**: 6447-6459.
- Ferro-Novick, S., Hansen, W., Schauer, I. y Schekman, R. 1984a. Genes required for completion of import of proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* **98**: 44-53.
- Ferro-Novick, S. y Jahn, R. 1994. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* **370**: 191-193.
- Ferro-Novick, S., Novick, P., Field, C. y Schekman, R. 1984. Yeast secretory that block the formation of active cell surface enzymes. *J. Cell Biol.* **98**: 35-43.
- Fonzi, W. A. 1996. Diferential expresión of genes during morphogénesis. *Simposio Internacional: "Biología molecular, celular y patogénesis de Candida albicans"*, Valencia, España.
- Fonzi, W. A. y Irwin, M. Y. 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
- Fridkin, S. K. y Jarvis, W. R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 499-511.
- Fromtling, R. A. 1988. Overview of medically important antifungal derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.*
- Gaigg, G., Simbeni, R., Hrastnik, C., Paltauf, F. y Daum, G. 1995. Characterization of microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1234**: 214-220.
- Garrels, J. I., Latter, G. I. y Kobayashi, G. S. 1995. The YPD database: a resource for yeast biology and a guide for 2D analysis. *XVIIth International conference on yeast genetics and molecular biology. (Special issue)*. *Yeast* **11**: S629.

- Georgopapadakou, N. H. y Tkacz, J. S. 1995. The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol.* 3: 98-104.
- Georgopapadakou, N. H. y Walsh, T. J. 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 279-291.
- Gerring, S. L., Connelly, C. y Hieter, P. 1991. Positional mapping of genes by chromosome blotting and chromosome fragmentation. *Meth. Enzymol.* 194: 57-77.
- Gil, C., Pomés, R. y Nombela, C. 1988. A complementation analysis by parasexual recombination of *Candida albicans* morphological mutants. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1587-1595.
- Gil, C., Pomés, R. y Nombela, C. 1990. Isolation and characterization of *Candida albicans* morphological mutants derepressed for the formation of filamentous hypha-type structures. *J. Bacteriol.* 172: 2384-2391.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. H. y Kirsch, D. R. 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.* 198: 179-182.
- Jimeno, R. E., Espenshade, P. y Kaiser, C. A. 1995. *SED4* encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation. *J. Cell Biol.* 131: 325-338.
- Gnamusch, E., Kalaus, C., Hrastrnik, C., Paltauf, F. y Daum, G. 1992. Transport of phospholipids between subcellular membranes of wild-type yeast cells and of the phosphatidylinositol transfer protein-deficient strain *Saccharomyces cerevisiae* *sec14*. *Biochim. Biophys. Acta* 1111: 120-126.
- Goldman, R. C., Frost, D. J., Capobianco, J. O., Kadam, S., Rasmussen, R. R. y Abad-Zapatero, C. 1995. Antifungal drug targets: *Candida* secreted aspartyl protease and fungal wall β -glucan synthesis. *Infect. Agents Dis.* 4: 228-247.
- Goldway, M., Teff, D., Schmidt, R., Oppenheim, A. B. y Koltin, Y. 1995. Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the *BEN* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 422-426.
- Gómez de las Heras, F. 1996. Progress in the research and development of new antifungal agents. *Simposio internacional: "Biología molecular, celular y patogénesis de Candida albicans"*, Fundación Ramón Areces, Valencia, España.
- González, M. M., Díez-Orejas, R., Molero, G., Alvarez, A. M., Pla, J., Nombela, C. y Sanchez, M. 1997. Phenotypic characterization of a *Candida albicans* strain deficient in its major exoglucanase. *En prensa*.
- Gooday, G. W. 1995. The potential of novel antifungal drugs for the treatment of the disease in the immunocompromised host. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 4: 679-691.
- Görlich, D. y Rapoport, T. A. 1993. Protein translocation into proteolysosomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75: 615-630.
- Gorman, J. A., Chan, W. y Gorman, J. W. 1991. Repeated use of *GAL1* for gene disruption in *Candida albicans*. *Genetics* 129: 19-24.
- Goshorn, A. K., Grindle, S. M. y Scherer, S. 1992. Gene isolation by complementation in *Candida albicans* and applications to physical and genetic mapping. *Infect. Immun.* 60: 876-884.
- Goshorn, A. K. y Scherer, S. 1989. Genetic analysis of prototrophic natural variants of *Candida albicans*. *Genetics* 123: 667-673.
- Gow, N. A. R. y Gooday, G. W. 1987. Cytological aspects of dimorphism in *Candida albicans*. *Crit. Rev. Microbiol.* 15: 73-78.
- Gow, N. A. R., Robbins, P. W., Lester, J. W., Brown, A. J. P., Fonzi, W. A., Chapman, T. y Kinsman, O. S. 1994. A hyphal-specific chitin synthase gene (*CHS2*) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6216-6220.
- Gow, N. A. R., Swoboda, R., Bertram, G., Gooday, G. W. y Brown, A. J. P. 1993. Key genes in the regulation of dimorphism of *Candida albicans*. En *Dimorphic Fungi in Biology and Medicine*. van den Bossche, H., Odds, F. y Kerridge, D. (eds.), Plenum Press, New York. pp: 61-72.
- Graham, T. R. y Erm, S. D. 1991. Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast *sec18* (NSF) mutant. *J. Cell Biol.* 114: 207-218.

- Grupo de trabajo EPINE** 1995. *Prevalencia de las infecciones nosocomiales en los hospitales españoles. Epine 1990-1994*. Sociedad Española de Higiene y Medicina Preventiva Hospitalarias, Barcelona.
- Gu, M., Warshawsky, I. y Majerus, P. W.** 1992. Cloning and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to retinaldehyde-binding protein and yeast SEC14p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2980-2984.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanahan, D.** 1988. Techniques for transformation of *E. coli*. En *DNA cloning*. Glover, D. M. (eds.), 1ª ed. IRL Press, Oxford. Cap.1, pp: 109-135.
- Hann, B. C. y Walter, P.** 1991. The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* **67**: 131-144.
- Hannun, Y. A.** 1994. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* **269**: 3125-3128.
- Harsay, E. y Bretscher, A.** 1995. Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J. Cell Biol.* **131**: 297-310.
- Hay, J. C., Fiset, P. L., Jenkins, G. H., Fukami, K., Takenawa, T., Anderson, R. A. y Martin, T. F. J.** 1995. ATP-dependent inositolide phosphorylation required for Ca^{2+} -activated secretion. *Nature* **374**: 173-177.
- Hay, J. C. y Martin, T. F. J.** 1992. Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins. *J. Cell Biol.* **119**: 139-151.
- Hay, J. C. y Martin, T. F. J.** 1993. Phosphatidylinositol transfer protein required for ATP-dependent priming of Ca^{2+} -activated secretion. *Nature* **366**: 572-575.
- Hechtberger, P. y Daum, G.** 1995. Intracellular transport of inositol-containing sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **367**: 201-204.
- Helmkamp, G. M.** 1990. Transport and metabolism of phosphatidylinositol in eukaryotic cells. *Subcell. Biochem.* **16**: 129-174.
- Helmkamp, G. M., Jr., Harvey, M. S., Wirtz, K. W. A. y Van Deenen, L. L. M.** 1974. Phospholipid exchange between membranes: purification of bovine brain proteins that preferentially catalyze the transfer of phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* **249**: 6382-6389.
- Herreros, E., García-Sáez, M. I., Nombela, C. y Sánchez, M.** 1992. A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation. *Mol. Microbiol.* **6**: 3567-3574.
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. y Tzagoloff, A.** 1986. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167.
- Hitchcock, C. A.** 1993. Resistance of *C. albicans* to antifungal agents. *Biochem. Soc. Trans.* **41**: 1039-1047.
- Hoyer, L. L., Magee, B. B., Rikkerink, E. H. y Scherer, S.** 1994. The ARG4 gene of *Candida albicans*. *Gene* **142**: 213-218.
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. P. y Gow, N. A. R.** 1994. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **14**: 87-99.
- Hurtley, S. M.** 1993. Hot line to the secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 3-6.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J.** 1990. *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. California.
- Ishii, N., Yamamoto, M., Yoshihara, F., Arisawa, M. y Aoki, Y.** 1997. Biochemical and genetic characterization of the Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*. *Microbiol.* **143**: 429-435.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A.** 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Iwaguchi, S.-I., Homma, M. y Tanaka, K.** 1990. Variation in the electrophoretic karyotype analysed by the assignment of DNA probes in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2433-2442.
- Janknegt, R., van Etten, E. W. M. y de Marie, S.** 1996. Lipid formulations of amphotericin B. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **9**: 403-406.

- Jenkins, G. H., Fiset, P. L. y Anderson, R. A. 1994. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **269**: 11547-11554.
- Jiang, W., Gerhold, D., Kmiec, E. B., Hauser, M., Becker, J. M. y Koltin, Y. 1997. The topoisomerase I from *Candida albicans*. *Microbiol.* **143**: 377-386.
- Kagiwada, S., Kearns, B. G., McGee, T. P., Fang, M., Hosaka, K. y Bankaitis, V. A. 1996. The yeast *BSD2-1* mutation influences both the requirement for the phosphatidylinositol transfer protein and derepression of phospholipid biosynthetic gene expression in yeast. *Genetics* **143**: 685-698.
- Karyotakis, N. C. y Anaissie, E. J. 1994. The new antifungal azoles: fluconazole and itraconazole. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **7**: 658-666.
- Kauffmann-Zeh, A., Thomas, G. M. H., Ball, A., Prosser, S., Cunningham, E., Cockcroft, S. y Hsuan, J. J. 1995. Requirement for phosphatidylinositol transfer protein in epidermal growth factor signaling. *Science* **268**: 1188-1190.
- Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J. y Iwasaki, S. 1989. The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature* **341**: 164-166.
- Kearns, B. G., McGee, T. P., Mayinger, P., Gedvilaite, A., Phillips, S. E., Kagiwada, S. y Bankaitis, V. A. 1997. Essential role for diacylglycerol in protein transport from yeast Golgi complex. *Nature* **387**: 101-105.
- Kelly, R., Miller, S. M. y Kurtz, M. B. 1988. One-step gene disruption by cotransformation to isolate double auxotrophs in *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 24-31.
- Kelly, R., Miller, S. M., Kurtz, M. B. y Kirsch, D. R. 1987. Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one step gene disruption to isolate *ura3* mutants. *Mol. Cell Biol.* **7**: 199-208.
- Kerridge, D. 1986. Mode of action of clinically important drugs. *Adv. Microb. Physiol.* **27**: 1.
- Kirsch, D. R., Kelly, R. y Kurtz, M. B. 1990. *The genetics of Candida*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Klionsky, D. J., Herman, P. K. y Erm, S. D. 1990. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **54**: 266-292.
- Klotz, S. A., Smith, R. L. y Stewart, B. W. 1992. Effect of an arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide of hematogenous candidal infections in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 132-136.
- Köhler, J. R. y Fink, G. R. 1996. *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13223-13228.
- Kohlwein, S. D., Daum, G., Schneiter, R. y Paltauf, F. 1996. Phospholipids: synthesis, sorting, subcellular traffic-the yeast approach. *Trends Cell Biol.* **6**: 260-266.
- Koul, A., Chandra, J. y Prasad, R. 1995. Morphological mutants of *Candida albicans*. *Biochem. Molec. Biol.* **35**: 1215-1224.
- Ktistakis, N. T., Brown, H. A., Waters, M. G., Sternweis, P. C. y Roth, M. G. 1996. Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J. Cell Biol.* **134**: 295-306.
- Kurtz, M. B., Cortelyou, M. W. y Kirsch, D. R. 1986. Integrative transformation of *Candida albicans* using a cloned *Candida ADE2* gene. *Mol. Cell Biol.* **6**: 142-149.
- Kurtz, M. B., Cortelyou, M. W., Miller, S. M., Lai, M. y Kirsch, D. R. 1987. Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol. Cell Biol.* **7**: 209-217.
- Kurtz, M. B., Kirsch, D. R. y Kelly, R. 1988. The molecular genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Sci.* **5**: 58-63.
- Kurtz, M. B. y Marrinan, J. 1989. Isolation of *hem3* mutants from *Candida albicans* by sequential gene disruption. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 47-52.
- Lavandera, J. L. 1995. Nuevas estrategias en la búsqueda de agentes antimicrobianos. XV Congreso nacional de Microbiología, Sociedad Española de Microbiología, Madrid, España. 48 (SM 4.4).
- Leberer, E., H Marcus, D., Broadbent, I. D., Clark, K. L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmit, A., Gow, N. A. R., Brown, A. J. P. y Thomas, D. Y. 1996. Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13217-13222.

- Lee, K. L., Buckley, H. R. y Campbell, C. C. 1975. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **13**: 148-153.
- Leuker, C. E. y Ernst, J. F. 1994. Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (anticodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: in vivo evidence for non-standard decoding of CUG codons. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 212-217.
- Leuker, C. E., Hahn, A. M. y Ernst, J. F. 1992. β -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 235-241.
- Lian, J. P. y Ferro-Novick, S. 1993. Bos1p, an integral membrane protein of endoplasmic reticulum to Golgi transport vesicles, is required for their fusion competence. *Cell* **73**: 735-745.
- Lian, J. P., Stone, S., Jiang, Y., Lyons, P. y Ferro-Novick, S. 1994. Ypt1p implicated in v-SNARE activation. *Nature* **372**: 698-701.
- Linardic, C. M. y Hannun, Y. A. 1994. Identification of a distinct pool of sphingomyelin involved in the sphingomyelin cycle. *J. Biol. Chem.* **269**: 23530-23537.
- Liu, H., Köhler, J. y Fink, G. R. 1994. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**: 1723-1726.
- Lodge, J. K., Jackson-Machelski, E., Devadas, B., Zupec, M. E., Getman, D. P., Kishore, N., Freeman, S. K., McWherter, C. A., Sikorski, J. A. y Gordon, J. I. 1997. N-Myristoylation of Arf proteins in *Candida albicans*: an *in vivo* assay for evaluating antifungal inhibitors of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase. *Microbiol.* **143**: 357-366.
- Lopez, M. C., Nicaud, J. M., Skinner, H. B., Vergnolle, C., Kader, J. C., Bankaitis, V. A. y Gaillardin, C. 1994. A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form. *J. Cell Biol.* **125**: 113-127.
- Lorincz, A. 1984. Quick preparation of plasmid DNA from yeast. *Focus* **6**: 11.
- Madani, N. D., Malloy, P. J., Rodriguez Pombo, P., Krishnan, A. V. y Feldman, D. 1994. *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 922-926.
- Magee, B. B., Chibana, H., Scherer, S. y Magee, P. T. 1996. Physical map and molecular analysis of *Candida albicans*. *Simposio internacional: "Biología molecular, celular y patógenesis de Candida albicans"*, Fundación Ramón Areces, Valencia, España.
- Magee, B. B., Koltin, Y., Gorman, J. y Magee, P. T. 1988. Assignment of cloned *C. albicans* genes to bands on the electrophoretic karyotype. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4721-4726.
- Mahrous, M., Lott, T. J., Meyer, S. A., Sawant, A. D. y Ahearn, D. G. 1990. Electrophoretic karyotyping of typical and atypical *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 876-881.
- Malathi, K., Ganesan, K. y Datta, A. 1994. Identification of a putative transcription factor in *Candida albicans* that can complement the mating defect of *Saccharomyces cerevisiae* *ste12* mutants. *J. Biol. Chem.* **269**: 22945-22951.
- Martin, T. F. J. 1997. Greasing the Golgi budding machine. *Nature* **387**: 21-22.
- Matthews, R. C. 1994. Pathogenicity determinants of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy? *Microbiol.* **140**: 1505-1511.
- Mayinger, P., Bankaitis, V. A. y Meyer, D. I. 1995. Sac1p mediates the adenosine triphosphate transport into yeast endoplasmic reticulum that is required for protein translocation. *J. Cell Biol.* **131**: 1377-1386.
- McGee, T. P., Skinner, H. B., Whitters, E. A., Henry, S. A. y Bankaitis, V. A. 1994. A phosphatidylinositol transfer protein controls the phosphatidylcholine content of yeast Golgi membranes. *J. Cell Biol.* **124**: 273-287.
- Meyhack, B., Bajwa, W., Rudolph, H. y Hinnen, A. 1982. Two yeast acid phosphatase structural genes are the result of a tandem duplication and show different degrees of homology in their promoter and coding sequences. *EMBO J.* **1**: 675-680.
- Mio, T., Yabe, T., Sudoh, M., Satoh, Y., Nakajima, T., Arisawa, M. y Yamada-Okabe, H. 1996. Role of three chitin Synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **178**: 2416-2419.
- Mio, T., Yamada-Okabe, T., Yabe, T., Nakajima, T., Arisawa, M. y Yamada-Okabe, H. 1997. Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* *KRE6* and *SKN1*: Expression and physiological function. *J. Bacteriol.* **179**: 2363-2372.

- Monaco, M. E. y Gershengorn, M. C. 1992. Subcellular organization of receptor-mediated phosphoinositide turnover. *Endocrinol. Rev.* **13**: 707-718.
- Monk, B. C., Niimi, M. y Shepherd, M. G. 1993. The *Candida albicans* plasma membrane and H⁺-ATPase during yeast growth and germ tube formation. *J. Bacteriol.* **175**: 5566-5574.
- Monteoliva, L., Sánchez, M., Pla, J., Gil, C. y Nombela, C. 1996. Cloning of *Candida albicans* SEC14 gene homologue coding for a putative essential function. *Yeast* **12**: 1097-1105.
- Morrow, B., Srikantha, T., Anderson, J. y Soll, D. R. 1993. Coordinate regulation of two opaque-phase-specific genes during white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **61**: 1823-1828.
- Morrow, B., Srikantha, T. y Soll, D. R. 1992. Transcription of the gene for a pepsinogen, PEP1, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2997-3005.
- Mortimer, R. K. y Johnston, J. R. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**: 35-43.
- Mukhtar, M., Logan, D. A. y Kaufer, N. F. 1992. The carboxypeptidase Y-encoding gene from *Candida albicans* and its transcription during yeast-to-hyphae conversion. *Gene* **121**: 173-177.
- Myers, K. K., Fonzi, W. A. y Sypherd, P. S. 1992. Isolation and sequence analysis of the gene for translation elongation factor 3 from *Candida albicans*. *Nucleic. Acids. Res.* **20**: 1705-1710.
- Nair, J., Müller, H., Peterson, M. y Novick, P. 1990. Sec2 protein contains a coiled-coiled domain essential for vesicular transport and a dispensable carboxiterminal domain. *J. Cell Biol.* **110**: 1897-1909.
- Nakano, A. y Muramatsu, M. 1989. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **109**: 2677-2691.
- Navarro-García, F., Pérez-Díaz, R., Magee, B. B., Pla, J., Nombela, C. y Magee, P. T. 1995a. Chromosome reorganization in *Candida albicans* 1001 strain. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**: 361-366.
- Navarro-García, F., Sanchez, M., Pla, J. y Nombela, C. 1995. Functional characterization of the MKC1 gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 2197-2206.
- Negredo, A. I., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J. y Nombela, C. 1997. Cloning, analysis and one-step disruption of the ARG5,6 gene of *Candida albicans*. *Microbiol.* **143**: 297-302.
- Negredo, A. I., Navarro-García, F., Monteoliva, L., Hernández, M. L., Gil, C., Pla, J. y Nombela, C. 1997a. Use of two biosynthetic promoters as expression systems in *Candida albicans*. *XVIIIth Conference on yeast genetics and molecular biology. (Special issue)*. *Yeast* **13**: S86.
- Nieto, A., Sanz, P., Sentandreu, R. y del Castillo Agudo, L. 1993. Cloning and characterization of the SEC18 gene from *Candida albicans*. *Yeast* **9**: 875-887.
- Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Cell* **258**: 607-614.
- Nombela, C., Pomés, R. y Gil, C. 1987. Protoplasts fusion hybrids from *Candida albicans* morphological mutants. *Crit. Rev. Microbiol.* **15**: 79-85.
- Nombela, C., Pomés, R., Gil, C., Herreros, E. y Sanchez, M. 1989. Genetics of pathogenic fungi: *Candida albicans*. *Revista Ibérica de Micología* **6**: 47-53.
- Novick, P., Ferro, S. y Schekman, R. 1981. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* **25**: 461-469.
- Novick, P., Field, C. y Schekman, R. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**: 205-215.
- Novick, P., Osmond, B. C. y Botstein, D. 1989. Suppressors of yeast actin mutation. *Genetics* **121**: 659-674.
- Novick, P. y Schekman, R. 1979. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1858-1979.
- Odds, F. C. 1988. *Candida and candidosis*. 2^a ed. Baillière Tindall, London.

- Ohashi, M., De Vries, K. J., Frank, R., Snoek, G., Bankaitis, V. A., Wirtz, K. y Huttner, W. B. 1995. A role for phosphatidylinositol transfer protein in secretory vesicle formation. *Nature* 377: 544-547.
- Oki, T., Kakushima, M., Hirano, A., Takahashi, A., Ohta, A., Masuyoshi, M., Haroti, M. y Kamei, H. 1992. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of BMS-181184. *J. Antibiot.* 45: 1512-1517.
- Olaiya, A. F. y Sogin, S. J. 1979. Ploidy determination of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 140: 1043-1049.
- Orci, L., Palmer, D. J., Amherdt, M. y Rothman, J. E. 1993. Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from cytosol. *Nature* 364: 732-734.
- Ozaki, K., Terakita, A., Ozake, M., Hara, R., Hara-Nishimura, I., Mori, H. y Nishimura, M. 1994. Molecular and functional expression of squid retinal-binding protein. A novel species of hydrophobic ligand-binding protein. *J. Biol. Chem.* 269: 3838-3845.
- Pelham, H. R. B. 1991. Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 585-591.
- Pelham, H. R. B. 1994. About turn for the COPs? *Cell* 79: 1125-1127.
- Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-García, F., Sánchez, M. y Nombela, C. 1996. Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast* 12: 1677-1702.
- Pla, J., Pérez-Díaz, R. M., Navarro-García, F., Sánchez, M. y Nombela, C. 1995. Cloning of *Candida albicans* *HIS1* gene by direct homologous complementation of a histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector. *Gene* 165: 115-120.
- Pomés, R., Gil, C. y Nombela, C. 1985. Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2107-2113.
- Ponnambalam, S. y Banting, G. 1996. Protein secretion: Sorting sweet sorting. *Curr. Biol.* 6: 1076-1078.
- Pontón, J. 1996. Diagnóstico de laboratorio de las candidiasis invasivas. *Simposio internacional: "Biología molecular, celular y patogénesis de Candida albicans"*, Fundación Ramón Areces, Valencia, España.
- Poulain, D. 1996. Interactions between *Candida* and the host immune system through s-1,2 linked oligomannosides. *Simposio internacional: "Biología molecular, celular y patogénesis de Candida albicans"*, Fundación Ramón Areces, Valencia, España.
- Prasad, R., De Wergifosse, P., Goffeau, A. y Balzi, E. 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* 27: 320-329.
- Pratt, W. B. 1981. *Quimioterapia de la infección*. Fondo Educativo Interamericano, U.S.A.
- Puoti, A., Desponds, C. y Conzelmann, A. 1991. Biosynthesis of mannosylinositol phosphoceramide in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on genes controlling the flow of secretory vesicles from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *J. Cell Biol.* 113: 515-525.
- Quindós, G. 1996. Candidiasis superficiales. Candidiasis por paciente infectados por el virus VIH. *Simposio internacional: "Biología molecular, celular y patogénesis de Candida albicans"*, Fundación Ramón Areces, Valencia, España.
- Quindós, G., San Millán, R., Robert, R., Bernard, R. y Pontón, J. 1997. Evaluation of Bichro-latex albicans, a new method for rapid identification of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1263-1265.
- Rambourg, A., Clermont, Y., Nicaud, J. M., Gaillardin, C. y Kepes, F. 1996. Transformations of membrane-bound organelles in *sec14* mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. *Anatom. Rec.* 245: 448-458.
- Rapoport, T. A., Rolls, M. M. y Jungnickel, B. 1996. Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 499-504.
- Rhee, S. G. y Choi, K. D. 1992. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267: 12393-12396.
- Riggsby, W. S., Torres-Bauza, L. J., Wills, J. W. y Townes, T. M. 1982. DNA content, kinetic complexity, and the ploidy question in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 2: 853-862.
- Rothman, J. E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372: 55-63.

- Rothman, J. E. y Orci, L. 1992. Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* **355**: 409-415.
- Rothman, J. E. y Wieland, F. T. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**: 227-228.
- Ryley, J. F. y Ryley, N. G. 1990. *Candida albicans*-do mycelia matter? *J. Med. Vet. Mycol.* **28**: 225-239.
- Saballs, P. 1996. Manejo clínico de fármacos antifúngicos. *Simposio internacional: "Biología molecular, celular y patogénesis de Candida albicans"*, Fundación Ramón Areces, Valencia, España.
- Salama, N. R. y Schekman, R. W. 1995. The role of coat proteins in the biosynthesis of secretory proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 536-543.
- Salama, S. R., Cleves, A. E., Malehorn, D. E., Whitters, E. A. y Bankaitis, V. A. 1990. Cloning and characterization of *Kluyveromyces lactis* SEC14, a gene whose product stimulates Golgi secretory function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**: 4510-4521.
- Saltarelli, C. G. 1989. *Candida albicans: the pathogenic fungus*. Hemisphere Publishing Corporation, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- San José, C., Alonso Monge, R., Pérez-Díaz, R., Pla, J. y Nombela, C. 1996. The mitogen-activated protein kinase homolog HOG1 controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **178**: 5850-5852.
- Sánchez, M. 1996. *Candida albicans* como modelo de hongo patógeno. *Simposio internacional: "Biología molecular, celular y patogénesis de Candida albicans"*, Fundación Ramón Areces, Valencia, España.
- Sánchez-Puelles, J. M. 1995. Criterios para la selección de dianas antifúngicas. *XV Congreso nacional de Microbiología*, Sociedad Española de Microbiología, Madrid, España. 48 (SM 4.3).
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. y Bille, J. 1997. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transport gene. *Microbiol.* **143**: 405-416.
- Santos, M. A. y Tuite, M. F. 1995. The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic. Acids. Res.* **23**: 1481-1486.
- Santos, M. A. S., Keith, G. y Tuite, M. F. 1993. Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *EMBO J.* **12**: 607-616.
- Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. y Fonzi, W. A. 1995. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 601-613.
- Sarthy, A. V., McGonigal, T., Coen, M., Frost, D. J., Meulbroek, J. A. y Goldman, R. C. 1997. Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3- β glucosyltransferase. *Microbiol.* **143**: 367-376.
- Schekman, R. y Orci, L. 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**: 1526-1533.
- Schmitt, H. 1993. New methods of delivery of Amphotericin B. *Clin. Infect. Dis.* **17**: S501-S506.
- Shen, L. L., Baranowski, J., Fostel, J., Montgomery, D. A. y Lartey, P. A. 1992. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 2778-2784.
- Sherwood, J., Gow, N. A. R., Gooday, G. W., Gregory, D. W. y Marshall, D. 1992. Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**: 461-469.
- Singer, S. C., Richards, C. A., Ferone, R., Benedict, D. y Ray, P. 1989. Cloning, purification, and properties of *Candida albicans* thymidylate synthase. *J. Bacteriol.* **171**: 1372-1378.
- Skinner, H. B., Alb, J. G., Jr., Whitters, E. A., Helmkamp, G. M., Jr. y Bankaitis, V. A. 1993. Phospholipid transfer activity is relevant to but not sufficient for the essential function of the yeast SEC14 gene product. *EMBO J.* **12**: 4775-4784.
- Skinner, H. B., McGee, T. P., McMaster, C. R., Fry, M. R., Bell, R. M. y Bankaitis, V. A. 1995. The *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein effects a ligand-dependent inhibition of choline-phosphate cytidylyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 112-116.

- Slutsky, B., Buffo, J. y Soll, D. R. 1985. High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* **230**: 666-669.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. y Soll, D. R. 1987. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **169**: 189-197.
- Smith, D. J., Cooper, M., Detiani, M., Losberger, C. y Payton, M. A. 1992. The *Candida albicans* *PMM1* gene encoding phosphomannomutase complements a *Saccharomyces cerevisiae* sec 53-6 mutation. *Curr. Genet.* **22**: 501-503.
- Smith, D. J., Proudfoot, A. E., Detiani, M., Wells, T. N. y Payton, M. A. 1995. Cloning and heterologous expression of the *Candida albicans* gene *PMI1* encoding phosphomannose isomerase. *Yeast* **11**: 301-310.
- Snoek, G. T., de Wilt, I. S. C., van Mourik, J. H. G. y Wirtz, K. W. A. 1992. The phosphatidylinositol transfer protein in 3T3 mouse fibroblast cells is associated with the Golgi system. *J. Cell. Biochem.* **49**: 339-348.
- Snoek, G. T., Westerman, J., Wouters, F. S. y Wirtz, K. W. A. 1993. Phosphorylation and redistribution of the phosphatidylinositol-transfer protein in phorbol 12-myristate 13-acetate- and bombesin-stimulated Swiss mouse 3T3 fibroblasts. *Biochem. J.* **291**: 649-656.
- Soll, D. R. 1986. The regulation of cellular differentiation in the dimorphic yeast *Candida albicans*. *BioEssays* **5**: 5-11.
- Soll, D. R. 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 183-203.
- Soll, D. R. 1993. High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* **9**: 61-65.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. y Rothman, J. E. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**: 318-324.
- Srikantha, T., Klapach, A., Lorenz, W. W., Tsai, L. K., Laughlin, L. A., Gorman, J. A. y Soll, D. R. 1996. The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescence reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **178**: 121-129.
- Srikantha, T. y Soll, D. R. 1993. A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *Gene* **131**: 53-60.
- Staab, J. F., Ferrer, C. A. y Sundstrom, P. 1996. Developmental expression of a tandemly repeated, proline and glutamine rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **271**: 6298-6305.
- Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E. y Ernst, J. F. 1997. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* **16**: 1982-1991.
- Sudoh, M., Nagahashi, S., Doi, M., Ohta, A., Takagi, M. y Arisawa, M. 1993. Cloning of the chitin synthase 3 gene from *Candida albicans* and its expression during yeast-hyphal transition. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 351-358.
- Swoboda, R. K., Bertram, G., Budge, S., Gooday, G. W., Gow, N. A. R. y Brown, A. J. P. 1995. Structure and regulation of the *HSP90* gene from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **63**: 4506-4514.
- Tanaka, S. y Hosaka, K. 1994. Cloning of a cDNA encoding a second phosphatidylinositol transfer protein of rat brain by complementation of the yeast *sec14* mutation. *J. Biochem. (Tokyo)* **115**: 981.
- Tanaka, S., Yamashita, S. y Hosaka, K. 1995. Cloning and expression of human cDNA encoding phosphatidylinositol transfer protein β . *Biochim. Biophys. Acta* **1259**: 199-202.
- Tanner, W. y Lehle, L. 1987. Protein glycosylation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **906**: 81-99.
- TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D. y Novick, P. 1996. The exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**: 6483-6494.
- Thomas, G. M. H., Cunningham, E., Fensome, A., Ball, A., Totty, N. F. y Cockcroft, S. 1993. An essential role for phosphatidylinositol transfer protein in phospholipase C-mediated inositol lipid signaling. *Cell* **74**: 919-928.
- Tremblay, J. M., Helmkamp, G. M. y Yarbrough, L. R. 1996. Limited proteolysis of rat phosphatidylinositol transfer protein by trypsin cleaves the C terminus, enhances binding to lipid vesicles, and reduces phospholipid activity. *J. Biol. Chem.* **271**: 21075-21080.

- Vahlensieck, Y., Riezman, H. y Meyhack, B. 1995. Transcriptional studies on yeast *SEC* genes provide no evidence for regulation at the transcriptional level. *Yeast* **11**: 901-911.
- Van Paridon, P. A., Gadella, T. W. J., Somerharju, P. J. y Wirtz, K. W. A. 1987. On the relationship between the dual specificity of the bovine brain phosphatidylinositol transfer protein and membrane phosphatidylinositol levels. *Biochim. Biophys. Acta* **903**: 68-77.
- Vanden Bossche, H., Marichal, P. y Odds, F. C. 1994. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.* **2**: 393-400.
- Vithelic, T. S., Goelb, M., Milligan, S., O'Tousa, J. E. y Hyde, D. R. 1993. Localization of *Drosophila* retinal degeneration B, a membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein. *J. Cell Biol.* **122**: 1013-1022.
- Vithelic, T. S., Hyde, D. R. y O'Tousa, J. E. 1991. Isolation and characterization of the *Drosophila* retinal degeneration (*rdgB*) gene. *Genetics* **127**: 761-768.
- Walent, J. H., Porter, B. W. y Martin, T. F. J. 1992. A novel 145 kD brain cytosolic protein reconstitutes Ca^{2+} -activated secretion in permeable neuroendocrine cells. *Cell* **70**: 765-775.
- Weinberg, R. A., McWherter, C. A., Freeman, S. K., Wood, D. C., Gordon, J. I. y Lee, S. C. 1995. Genetics studies reveal that myristoylCoA:protein N-myristoyltransferase is an essential enzyme in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **16**: 241-250.
- Westerman, J., De Vries, K. J., Somerharju, P. J., Timmermans-Hereijgers, J. L. P. M., Snoek, G. T. y Wirtz, K. W. A. 1995. A sphingomyelin-transferring protein from chicken liver. *J. Biol. Chem.* **270**: 14263-14266.
- Whelan, W. L. y Magee, P. T. 1981. Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **145**: 726-729.
- Whelan, W. L., Partridge, R. M. y Magee, P. T. 1980. Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.* **180**: 107-113.
- Whelan, W. L. y Soll, D. R. 1982. Mitotic recombination in *Candida albicans*: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **187**: 477-485.
- White, T. C., Andrews, L. E., Maltby, D. y Agabian, N. 1995. The "universal" leucine codon CTG in the secreted aspartyl proteinase 1 (*SAP1*) gene of *Candida albicans* encodes a serine *in vivo*. *J. Bacteriol.* **177**: 2953-2955.
- Whitters, E. A., Cleves, A. E., McGee, T. P., Skinner, H. B. y Bankaitis, V. A. 1993. SAC1p is an integral membrane protein that influences the cellular requirement for phospholipid transfer protein function and inositol in yeast. *J. Cell Biol.* **122**: 79-94.
- Wickes, B., Staudinger, J., Magee, B. B., Kwon-Chung, K. J., Magee, P. T. y Scherer, S. 1991. Physical and genetic mapping of *Candida albicans*: several genes previously assigned to chromosome 1 map to chromosome R, the rDNA-containing linkage group. *Infect. Immun.* **59**: 2480-2484.
- Wirtz, K. W. A. 1991. Phospholipid transfer proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 73-99.
- Wuestehube, L. J., Duden, R., Eun, A., Hamamoto, S., Korn, P., Ram, R. y Schekman, R. 1996. New mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affected in the transport of proteins from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Genetics* **142**: 393-406.
- Yamaki, H., Yamaguchi, M., Imamura, H., Suzuki, H., Nishimura, T., Saito, H. y Yamaguchi, H. 1990. The mechanism of antifungal action of (S)-2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoic acid, RI-331: the inhibition of homoserine dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**: 837-843.
- Yokogawa, T., Suzuki, T., Ueda, T., Mori, M., Ohama, T., Kuchino, Y., Yoshinari, S., Motoki, I., Nishikawa, K. y Osawa, S. 1992. Serine tRNA complementary to the nonuniversal serine codon CUG in *Candida cylindracea*: evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7408-7411.
- Zaret, K. S. y Sherman, F. 1982. DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* **28**: 563-573.

ANEXO

El trabajo realizado durante el transcurso de esta Tesis Doctoral ha sido incluido en las siguientes publicaciones:

Monteoliva, L., Sánchez, M., Pla, J., Gil, C. y Nombela, C. 1996. Cloning of *Candida albicans* *SEC14* gene homologue coding for a putative essential function. *Yeast* **12**: 1097-1105.

Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-García, F., Sánchez, M. y Nombela, C. 1996. Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast* **12**: 1677-1702.

Negredo, A. I., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J. y Nombela, C. 1997. Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*. *Microbiol.* **143**: 297-302.

Cloning of *Candida albicans* SEC14 Gene Homologue Coding for a Putative Essential Function

LUCÍA MONTEOLIVA, MIGUEL SÁNCHEZ, JESÚS PLA, CONCHA GIL AND CÉSAR NOMBELA*

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Received 19 February 1996; accepted 12 April 1996

The yeast *SEC14* gene product is required for the transport of proteins from the Golgi complex. We have cloned the homologous *Candida albicans* *SEC14* gene (*CaSEC14*) by functional complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive mutant, *sec14^{ts}*. Some putative TATA boxes have been identified in *CaSEC14* and, contrary to *S. cerevisiae* *SEC14*, no introns were found in the *Candida* homologue. Sequence analysis revealed that *CaSec14p* is a 301 amino acid protein, 67% identical to *S. cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* *Sec14p*, and 61% identical to the 300 amino-terminal residues of *Yarrowia lipolytica* *Sec14p*. Hydrophatic profile analysis of *CaSec14p* suggests a soluble protein without transmembrane domains, as has been described for the *S. cerevisiae* counterpart. While it was easy to disrupt one allele of *SEC14* in *C. albicans*, repeated attempts to disrupt the second allele were unsuccessful, thus suggesting that the gene could be essential for vegetative growth in *C. albicans*. The sequence has been deposited in the EMBL data library under Accession Number X81937.

KEY WORDS — *SEC14*; *Candida albicans*; protein secretion; pathogenic fungi; PI-TP

INTRODUCTION

Protein secretion is an essential process carried out by all living cells. In eukaryotes, the secretory pathway plays an essential role in cellular physiology, involving an initial translocation event of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) followed by transport from the ER to the Golgi apparatus and to the cell surface. In the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this process has been genetically analysed through isolation of different mutants (*sec*) specifically defective in defined steps of the protein secretion pathway (Novick *et al.*, 1980). Since these *sec* mutations affect membrane biogenesis and cell surface growth, which are processes essential for normal cell growth, mutants have been obtained displaying a conditional lethal temperature-sensitive phenotype: at the non-permissive temperature (37°C), they accumulate different types of intracellular organelle structures (such as the ER and secretory vesicles) and the proteins that would normally be secreted remain inside the cell, frequently associated with the accumulated organelles.

One of these mutations in the *SEC14* gene, *sec14^{ts}*, blocks the transport of proteins at the yeast Golgi complex level (Bankaitis *et al.*, 1989). Gene disruption experiments indicate that *SEC14* is an essential gene for *S. cerevisiae* vegetative growth. The discovery of homologues of this gene in *Kluyveromyces lactis* (Salama *et al.*, 1990), *Schizosaccharomyces pombe* (Bankaitis *et al.*, 1989) and *Yarrowia lipolytica* (Lopez *et al.*, 1994) is consistent with the important role attributed to the corresponding gene product. For example, although in *Y. lipolytica* *Sec14p* is not an essential protein, it is assumed to play a role in the dimorphic transition of this fungus. Biochemical work has established that *Sec14p* is a phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein (PI-TP) (Bankaitis *et al.*, 1990) that localizes as a peripheral Golgi membrane protein (Cleves *et al.*, 1991). In its phosphatidylcholine-bound form, *Sec14p* represses the CDP-choline pathway in yeast Golgi membranes by inhibiting choline-phosphate cytidyltransferase, regulating in this way the lipid composition of the membranes and making them functional for secretion (Skinner *et al.*, 1995). The importance of *Sec14p* is demonstrated by the recent isolation of rat cDNAs

*Corresponding author.

Table 1. Strains used in this study.

Strain	Relevant genotype	Source or reference
<i>S. cerevisiae</i> CTY1-1A	<i>MATa ura3-52 Δhis3-200 lys2-801^{am} sec14-1^{ts}</i>	Salama <i>et al.</i> (1990)
<i>E. coli</i> DH5αF'	<i>K-12 Δ(lacZYA-argF)_{u169}supE44 thi-1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA relA1 (φ80lacZΔM15)F'</i>	Glover (1985)
MC1061	<i>araD139Δ(ara-leu)7697 Δ(lac)X74 galU galK strA</i>	Navarro-García <i>et al.</i> (1995b)
<i>C. albicans</i> 1006	<i>MPA1 ser57 ura3 lys1 arg4</i>	Goshorn and Scherer (1989)
1001	Wild type from CECT, ATCC64385	Gil <i>et al.</i> (1988)
SC5314	Wild type	Gillum <i>et al.</i> (1984)
CA14	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	Fonzi and Irwin (1993)
CNC20	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>CaSEC14/casec14Δ::hisG-CaURA3-hisG</i>	This study
CNC21	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>CaSEC14/casec14Δ::hisG</i>	This study

coding for phosphatidylinositol transfer proteins that complement *sec14* mutations in *S. cerevisiae* (Dickenson *et al.*, 1989; Tanaka and Hosaka, 1994) and a human phosphatidylinositol transfer protein whose sequence is very similar to the rat proteins (Dickenson *et al.*, 1994). Recently, a role for all these PI-TP, including mammalian and yeast proteins, in secretory vesicle formation has been suggested (Ohashi *et al.*, 1995).

Interest in the study of essential functions of *Candida albicans* at the molecular level has increased in recent years because of the elevated incidence of *Candida* infections among industrialized countries. To date, *C. albicans* is the most common cause of fungal infections in immunocompromised patients, being responsible for the development of infections in almost 90% of these patients at some point during the course of their disease (Dupont *et al.*, 1992). Currently, few antifungal drugs are available and these have important side-effects which often limit their therapeutic usefulness. Here, we describe the cloning and characterization of the *C. albicans* *SEC14* gene homologue and demonstrate its essential function in this organism. Our data suggest that Sec14p could play an important role in the pathogenic fungus *C. albicans* and it may therefore be used as a promising novel antifungal target.

MATERIALS AND METHODS

Strains, media and growth conditions

The strains and plasmids used in this work are described in Tables 1 and 2 respectively. The construction of the *C. albicans* 1001 genomic DNA library has been described before (Navarro-García *et al.*, 1995b). *Escherichia coli* strains DH5α and MC1061 were used for standard plasmid amplification, grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) or terrific broth (TB) medium supplemented with 100 µg/ml for plasmid selection.

Electroporation (Becker and Guarente, 1991) was used for amplification of plasmids isolated from yeast. *S. cerevisiae* and *C. albicans* strains were routinely grown in YED medium (1% yeast extract, 2% glucose) or in SD minimal medium (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose) supplemented with the appropriate auxotrophic requirements. The filamentation ability of *C. albicans* strains was tested in Lee's medium (Lee *et al.*, 1975).

DNA manipulations

All DNA manipulations were carried out essentially according to standard procedures (Ausubel *et al.*, 1993; Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid DNA

Table 2. Plasmids used in this study.

Name	Description	Source
pYEura3	<i>S. cerevisiae</i> centromeric plasmid	Clontech
pLM1	Original plasmid isolated in the screening carrying an 8 kbp insert with <i>CaSEC14</i>	This study
pLM1a	A YEpl352 derivative carrying a 4 kbp <i>HindIII</i> - <i>Bam</i> HI fragment from pLM1	This study
pLM1b	A YEpl352 derivative carrying a 4 kbp <i>HindIII</i> - <i>HindIII</i> fragment from pLM1	This study
pCEN1	A pYEura3 derivative carrying a 3.4 kbp <i>SpeI</i> - <i>SpeI</i> fragment from pLM1	This study
pLY1	A YEpl352 derived vector that contains a 2.1 kbp <i>EcoRI</i> - <i>EcoRI</i> fragment (which comprises most of the <i>CaSEC14</i> ORF but lacks a fragment C-terminal corresponding to 14 amino acids) into the <i>EcoRI</i> restriction site	This study
pLU1	A pUC19 derivative carrying the same <i>EcoRI</i> - <i>EcoRI</i> fragment as pLY1 into the <i>EcoRI</i> restriction site	This study
pSLK2	SK Bluescript with the <i>Bam</i> HI site filled with Klenow enzyme and religated	This study
pSLK3B	pSLK2 derivative with a 3.4 kbp <i>SpeI</i> - <i>SpeI</i> fragment carrying <i>CaSEC14</i> inserted at the <i>SpeI</i> restriction site	This study
pLIS4	pSLK3B derivative in which the internal 0.5 kbp <i>AvaIII</i> - <i>Bam</i> HI region of <i>CaSEC14</i> has been replaced with the <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> II fragment containing the <i>hisG</i> - <i>CaURA3</i> - <i>hisG</i> construction	This study

was isolated from *S. cerevisiae* by a procedure described elsewhere (Polaina and Adam, 1991). Southern hybridization analyses were carried out using the Nonradioactive Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim) under high-stringency conditions (68°C) in positively charged nylon membranes following the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) analysis was carried out in a Perkin-Elmer Cetus DNA thermal cycler. Pulse field gel electrophoresis (PFGE) and Southern hybridizations were used to map the *CaSEC14* gene in 1001, 1006 and WO-1 *C. albicans* karyotypes (Navarro-García *et al.*, 1995a).

Genetic transformation procedures

E. coli was routinely transformed according to the method of Hanahan (Glover, 1985) except for the recovery of plasmids from yeast, in which electroporation was used since it gave significantly higher frequencies. *S. cerevisiae* was normally transformed by the lithium acetate protocol (Ito *et al.*, 1983). For the screening of the *C. albicans* gene library, however, electroporation was carried out using an ElectroCell Manipulator 600 (BTX Laboratories). Aliquots of 400 µl of electrocompetent cells (Becker and Guarente, 1991) were subjected to 1400 V for 5 ms, resulting in approximately 10⁵ transformants/µg DNA, which were selected at 37°C on minimal medium. *C. albicans* transformation was done following the standard protoplast procedure (Herreros *et al.*, 1992).

Candida gene disruption

Disruption of the *CaSEC14* gene was achieved by the two sequential transformation procedures described by Fonzi (Fonzi and Irwin, 1993). pLIS4 (see Table 2) was digested with *SpeI* and used to transform *C. albicans* CA14 strain, obtaining CNC20, a transformant in which the chromosomal *CaSEC14* gene was correctly replaced with the *CaSEC14*-*hisG*-*URA3*-*hisG*-*CaSEC14* cassette. CNC21, a Ura⁻ derivative resulting from an intra-chromosomal recombination step, was selected as described (Fonzi and Irwin, 1993) except that first, 0.5 mg/ml 5-FOA and 25 µg/ml uridine were used in the final selection medium and, second, prior to 5-FOA selection, cells were grown in liquid YED medium supplemented with uridine at 30°C for 48 h. The genotypes of both Ura⁺ (CNC20) and Ura⁻ (CNC21) transformants were checked by Southern blot analysis and PCR. In this case, the specific oligonucleotides: *I*secl (5'-GTCTAAGTA GTTGAACATTGATA-3'), which hybridized to *C. albicans* DNA close to the *CaSEC14* recombinant region; *Ohg* 1 (5'-GTTTTCCGCCATCG CAATCAGGC-3'), which hybridized to *Salmonella hisG* gene and *Oura3cr* (5'-GTGTAA CGAATCAATGGCACTACAGC-3'), which hybridized to *C. albicans URA3* gene were used.

DNA sequencing and homology analyses

A set of nested deletions was constructed in plasmid pLU1 using the Exonuclease III Nested

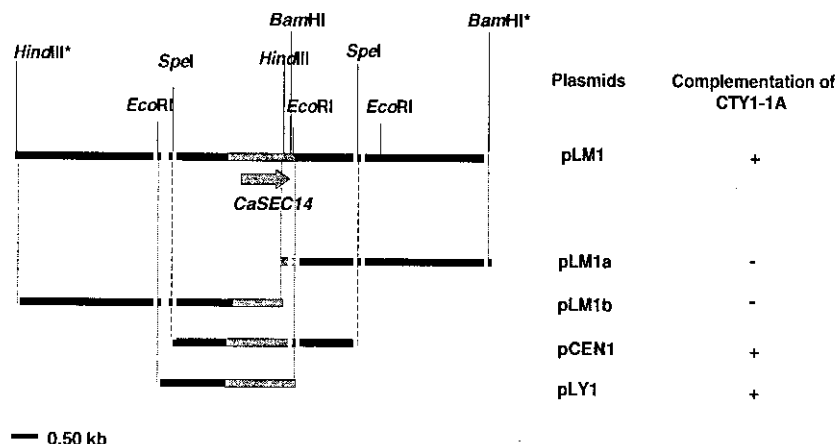


Figure 1. Restriction map of *CaSEC14* locus and DNA subfragments complementing the thermosensitive phenotype of *S. cerevisiae* CTY1-1A. Dotted blocks represent the *CaSEC14* ORF. Complementation of the CTY1-1A strain was analysed by transformation with the indicated plasmids. Restriction sites marked with (★) are derived from Yep352 polylinker.

Deletion Kit (Pharmacia), with *Sma*I as protected termini and *Pst*I as unprotected termini. Fluoresceinated oligonucleotides were designed to sequence specific regions not covered by the previous strategy. Plasmid DNA was purified from *E. coli* transformants with Qiagen (Diagen, Hilden, Germany) and sequenced with an Automated Sequencer (ALF, Pharmacia) according to Sanger (Sanger *et al.*, 1977) with fluoresceinated primers. Sequencing was carried out in the Automatic DNA Sequencing Unit of this University. Sequence comparisons and homologies were performed with the FASTA algorithm (Pearson and Lipman, 1988).

Enzymatic assays

Acid phosphatase and exoglucanase activities were studied in *C. albicans* CA14, CNC20 and CNC21 strains on agar plates according to published protocols (Cid *et al.*, 1994; Meyhack *et al.*, 1982).

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning of *C. albicans* SEC14 gene

A *C. albicans* genomic library constructed in the multicopy plasmid YEp352 (Navarro-García *et al.*, 1995b) was screened to determine whether a *sec14^{ts}* mutation in *S. cerevisiae* (strain CTY1-1A, *sec14-1*) could be functionally complemented by a *C. albicans* gene. Approximately 4×10^5 trans-

formants were screened by electroporation (see Materials and Methods) and 34 clones were initially identified by their ability to grow at 37°C. Only four transformants were further characterized. One out of four of these transformants was able to grow after 3 days of growth under selective conditions (37°C) and hence were fully complementing clones. The remaining three appeared after 5 days as slow-growing colonies and presumably had *C. albicans* multicopy suppressor genes whose characterization is currently under way. Upon retransformation the plasmid recovered from the first transformant, named pLM1, was confirmed to be responsible for the thermoresistant phenotype. A standard restriction analysis allowed us to establish that it displays an insert of 8 kbp (its restriction map is shown in Figure 1) as well as defining a 3.2 kbp *Spe*I-*Spe*I internal fragment still able to complement the thermosensitive phenotype of *S. cerevisiae* CTY1-1A, even in the centromeric plasmid pYEura3 (Clontech).

Sequence analysis of the *CaSEC14* gene

A 1330 bp fragment was sequenced (see Materials and Methods; EMBL accession number X81937). Analysis of this region (Figure 2) revealed an open reading frame (ORF) of 903 bp able to code for a 301 amino acids protein displaying extensive homology with *S. cerevisiae* Sec14p (Figure 3a). This gene was named *CaSEC14*.

```

TATCTTAGTTAATCTTTTCTATTATCTACTACTACAAAACATATTTGAGTTTCAATC 60
TTTTAGTTTGTGTTTCTTTTCTTTTTCCTTGTCTTTTCACACACACACAGTAGA 120
CACACCCACACAGTTTCAACTTTCATTGCTTTTCTTTCTTTGCTTTCTGTTTCTTTT 180
TTTCAATATCCTCTCTTTTCTTCCCTTCTTCTTTATAAAACCTGTTTATTCTGTTGTA 240
TTTCAAAATGATTATATATCATCTTTTATTGGATACACAATTTTGATAATATATAG 300
TCCTATCTCATCCCATCTTTTGCCATTCTCATCCCATCCCACTAAATGACTACGATGACT 360
                                M T T M T

ACTGAAGAAATATTGGCTTCTTATCCACAAATCACCGCTCCAACCGATCAAACAGGTTAC 420
T E E I L A S Y P Q I T A P T D Q T G Y

ACATCAAATTTAACACCTGAACAAAAAACCACTTTAGATATATTAGACAACAATTAAC 480
T S N L T P E Q K T T L D I F R Q Q L T

GAATGGGTTTATAAGACAGATTAGATGATGCATCACTTTTAAGATTCTTAGAGCAAGA 540
E L G Y K D R L D D A S L L R F L R A R

AAATTTGATATTCAAAAGCTATTGATATGTTGTAGCTTGTGAAAAATGGAGAGAAGAT 600
K F D I Q K A I D M F V A C E K W R E D

TTTGGTGTAAATACCATTTTAAAAGATTTCATTATGAAGAAAAACCCATTGTTGCTAAA 660
F G V N T I L K D F H Y E E K P I V A K

ATGTATCCAACCTTATTATCAAAAGATGATAAAGATGGTCCGTCAGTTTATTTGAAGAA 720
M Y P T Y Y H K T D K D G R P V Y F E E

TTGGGTAAAGTTGATTAGTGAAAAATGTTGAAAAATCACTACTCAAGAACGTATGCTTAAA 780
L G K V D L V K M L K I T T Q E R M L K

AACTTGGTATGGGAATATGAAGCCATGTGTCAATATCGTTTACCTGCATGTTCAAGAAAA 840
N L V W E Y E A M C Q Y R L P A C S R K

GCTGGTTATTTAGTGGAAACTTCTGTACTGTGTTAGATTACTGGGTATTAGTGTGACT 900
A G Y L V E T S C T V L D L S G I S V T

TCAGCTTATAATGTCATTGGTTATGTTAGAGAAGCTTCAAAATTTGGTCAAGATTATTAT 960
S A Y N V I G Y V R E A S K I G Q D Y Y

CCGAAAGAATGGGTAATTTTATTTGATTATGCTCCATTTGGGTTTCTACTGCATTT 1020
P E R M G K F Y L I N A P F G F S T A F

AAATTATTTAAACCATTTTGGATCCAGTGACTGTTTCTAAAATTCATATTTAGGTTAT 1080
K L F K P F L D P V T V S K I H I L G Y

AGTTATAAAAAAGAAATTATTGAACAAATCCACCTCAAAATTTACAGTCAAATTTGGT 1140
S Y K K E L L K Q I P P Q N L P V K F G

GGTATGTCAGATGTTTCTGATGACGATTATTATTAAAAGATGTTGGTCTTGGAGAGAT 1200
G M S D V S D D D L L L K D V G P W R D

CCGAATTTCATTGGTCCAGAAGGTGAATGTCTAGAGCTTATAACATTTAATCATATACA 1260
P E F I G P E G E C P R A Y N I -

CGTACACACACACAAACATACATACCAACACACACACACACACCACGCACACCACA 1320
CACAAGCACC 1330

```

Figure 2. Nucleotide sequence of *CaSEC14* and deduced protein. Possible TATA boxes are highlighted by bold print. The *CaSEC14* sequence data are available from the EMBL/Gen Bank data libraries under the accession number X81937.

Hydrophatic profile analysis of the CaSec14p suggests a soluble protein without transmembrane domains, as has been described for its *S. cerevisiae* homologue. Computer-assisted analysis of this sequence using the consensus boxes for *S. cerevisiae* genes identified two putative TATA boxes (in bold Figure 2) at positions +215 and +256 of the nucleotide sequence, a stop codon (TAA) and the presence of a 3' terminal region enriched in cytosine and adenine residues. Interestingly, there were

no apparent splicing sites within the *Candida* gene, in contrast to *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica* homologues, which suggests the absence of introns. Absence of the last 14 residues of CaSec14p does not impair its biological function as determined by restriction and functional analyses (Figure 1 and Table 2).

The amino acid sequence of CaSec14p showed 67% identity with *S. cerevisiae* Sec14p as well as with *K. lactis* Sec14p and 61% with the 300

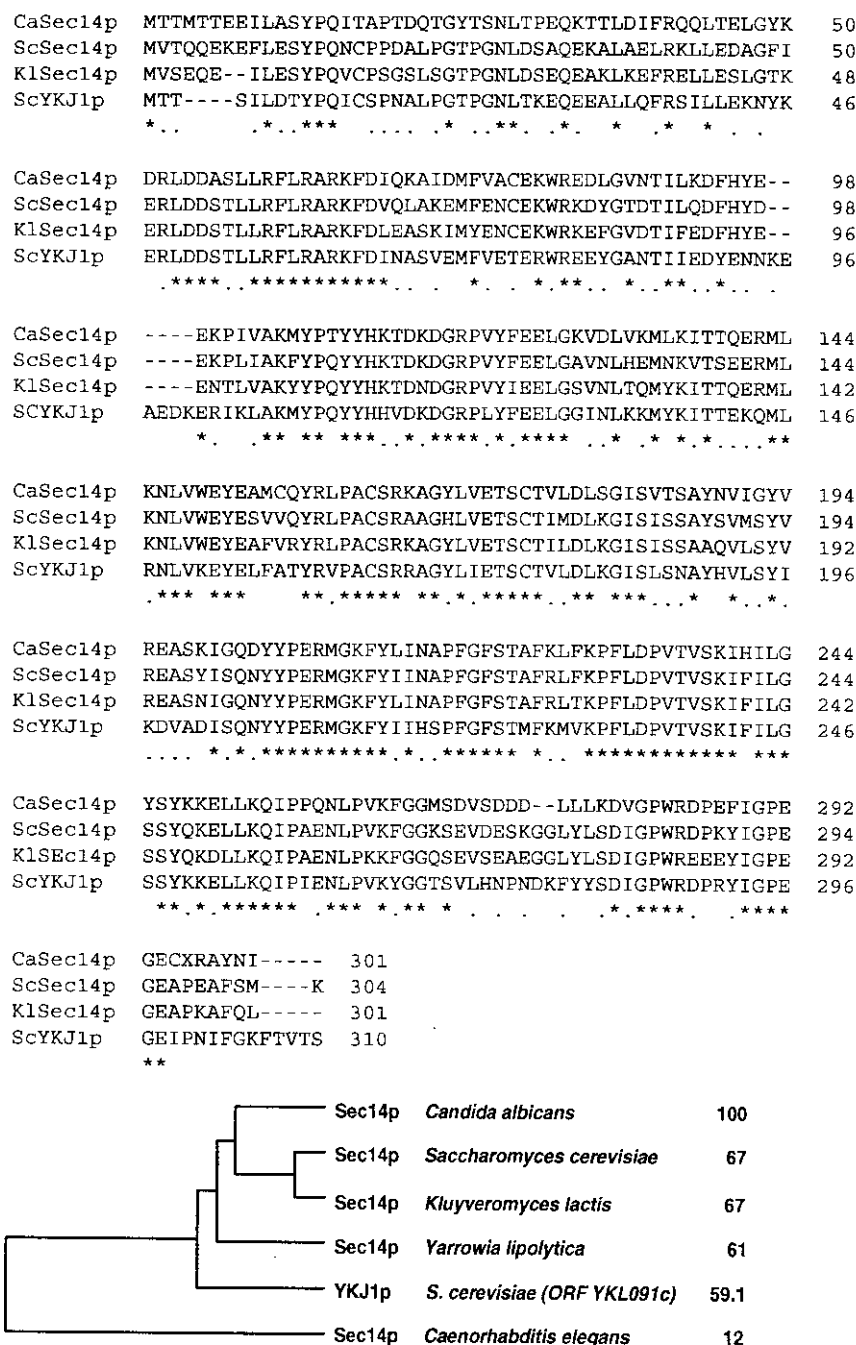


Figure 3. (a) Amino acid comparison between *C. albicans* Sec14p (CaSec14p) and Sec14p of other organisms: *S. cerevisiae* (ScSec14p), *Kluyveromyces lactis* (KlSec14p) and the hypothetical protein YKJ1p of *S. cerevisiae* (ScYKJ1p). Identical amino acids are denoted by (*) whereas similar residues are marked by (.). (b) Dendrogram analysis of CaSec14p with related proteins from other microorganisms. Numbers indicate the percentage of identity between CaSec14p and the homologue protein.

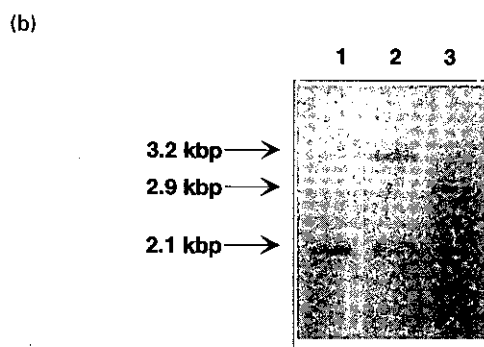
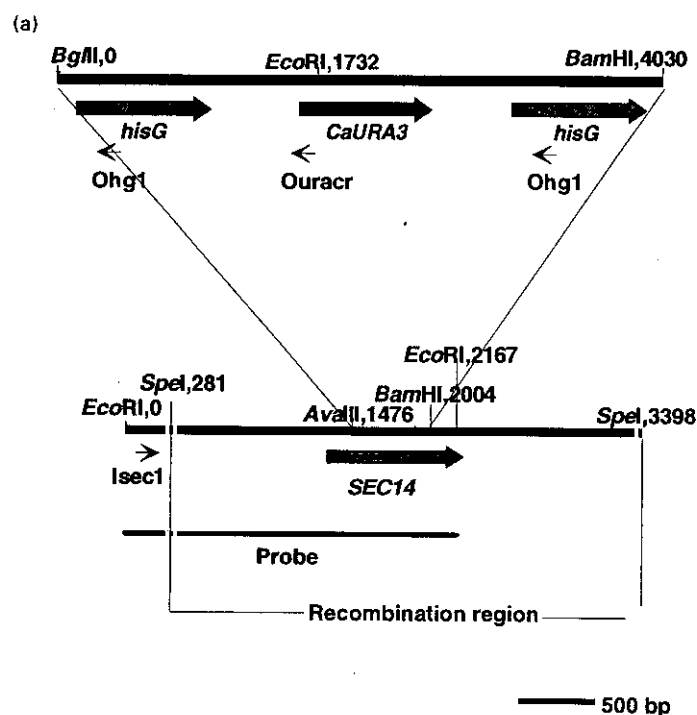


Figure 4. *CaSEC14* deletion strategy. (a) Strategy used for the deletion of one allele of the *CaSEC14* gene in *C. albicans* CA14 (see Materials and Methods). The 0.5 kbp *Ava*II-*Bam*HI fragment of the *CaSEC14* gene was deleted and substituted by the *hisG*-*CaURA3*-*hisG* construction (pLIS4). The construction was digested with *Spe*I to generate the recombinant DNA that was used to transform the CA14 strain. The location of the oligonucleotide primers Ohg1, Ourac3r and Isec1 used in PCR amplification to check the recombinants is shown. The probe used to check the gene replacement by Southern blot analysis is also shown. (b) Southern hybridization analysis of genomic DNAs from strains CA14 (lane 1), CNC20 (lane 2) and CNC21 (lane 3) digested with *Eco*RI using the 2.1 kbp *Eco*RI probe.

amino-terminal residues of *Y. lipolytica* Sec14p (Figure 3). CaSec14p also shares 59.1% identity with the YKLO91c ORF present in *S. cerevisiae* chromosome XI, whose function is still unknown.

These data demonstrate a high degree of conservation among the primary structure of fungal Sec14 proteins. However, CaSec14p has no significant sequence homology with other mammalian PI-TPs

(Dickenson *et al.*, 1989; Tanaka and Hosaka, 1994) despite the ability of these proteins to complement a yeast *sec14^{ts}* mutation.

Chromosomal localization of *sec14*

CaSEC14 mapped to chromosome 5 of *C. albicans* 1006 strain and to chromosomes 2 and 4 of *C. albicans* WO-1 strain (data not shown). This implies that *CaSec14* localizes to the 5M fragment of chromosome in the 1006 strain (Chu *et al.*, 1993).

Construction of a *SEC14/sec14Δ* heterozygote

For functional study of *CaSEC14*, we attempted to disrupt this gene by the usual stepwise procedure (Fonzi and Irwin, 1993). Strain CA14 (*ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434*) was integratively transformed with a gene construct in which the fragment *AvaIII-BamHI* of the *CaSEC14* gene had been replaced by the *hisG-CaURA3-hisG* cassette and this was digested with *SpeI*. Eight transformants were checked by PCR with two pairs of oligonucleotides; namely, *Isecl* and *Oura3cr* or *Isecl* and *OhgI*. *Isecl* hybridizes to the region adjacent to the recombination site while *Oura3cr* hybridizes with the *C. albicans URA3* gene (see Figure 4). Six of these clones were seen to carry the correct substitution that deleted the first allele. One of them, named CNC20, was chosen for recovering the initial auxotrophy by intrachromosomal recombination, by means of 5-FOA counterselection. Ten *Ura⁻* revertants were checked by PCR and eight of them were seen to have undergone the desired intrachromosomal recombination, thus yielding strain CNC21. CNC20 and CNC21 were also checked by Southern blot using a 2.1 kbp *EcoRI-EcoRI* probe (Figure 4).

Attempts to disrupt the second allele were carried out by transformation of strain CNC21, a *Ura⁻* revertant of the first transformation. The same construct was used for this second transformation but we could not identify any mutant strain with the second allele blasted among 60 transformants checked by Southern blot. We interpret this result as meaning that *CaSEC14* may be an essential gene in *C. albicans* as well as in *S. cerevisiae*.

In our experience, deletion of only one of the two alleles of a particular gene in *C. albicans* may lead to some kind of alteration in the phenotype, suggesting a potential effect of gene dosage or some kind of polymorphism in the two alleles. We

have observed this particular effect in the case of single deletants of the gene *MKCI* (Navarro-García *et al.*, 1995b). However, this does not seem to be the case of *CaSEC14*. The phenotypic characterization of strains CNC20 and CNC21 did not indicate any significant alteration in the pattern of growth or hyphae formation (data not shown). These single *CaSEC14* deletant strains (CNC20, CNC21) and CA14, were also analysed with regard to their secretion ability by measuring their capacity to export exoglucanase and acid phosphatase with negative results. We are currently obtaining several *SEC14* thermosensitive alleles which should allow us to test the role of protein secretion in pathogenic fungi and further test its usefulness as a potential antifungal target.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M. García Sáez for expert sequencing technical work (Servicio de Secuenciación Automatizada de DNA de la Universidad Complutense) and F. Navarro-García for his helpful advice in PFGE experiments. This investigation was supported by grant FIS93/0183 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias. L.M. is the recipient of a fellowship from the Universidad Complutense de Madrid.

REFERENCES

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. *et al.* (Eds) (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
- Bankaitis, V. A., Aitken, J. R., Cleves, A. E. and Dowhan, W. (1990). An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast. *Nature* **347**, 561–562.
- Bankaitis, V. A., Malehorn, D. E., Erm, S. D. and Greene, R. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae SEC14* gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J. Cell Biol.* **108**, 1271–1281.
- Becker, D. M. and Guarente, L. (1991). Transformation of yeast by electroporation. *Meth. Enzymol.* **194**, 182–187.
- Chu, W.-S., Magee, B. B. and Magee, P. T. (1993). Construction of an *SfiI* macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J. Bacteriol.* **175**, 6637–6651.
- Cid, V. J., Alvarez, A. M., Santos, A. I., Nombela, C. and Sánchez, M. (1994). Yeast exo-beta-glucanases can be used as efficient and readily detectable reporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 747–756.

- Cleves, A. E., McGee, T. P., Whitters, E. A. *et al.* (1991). Mutations in CDP-choline pathway for phospholipid transfer protein. *Cell* **64**, 789–800.
- Dickenson, S. K., Helmkamp, G. M. and Yarbrough, L. R. (1994). Sequence of a human cDNA encoding phosphatidylinositol transfer protein and occurrence of a related sequence in widely divergent eukaryotes. *Gene* **142**, 301–305.
- Dickenson, S. K., Lim, C. N., Schuyler, G. T., Dalton, T. P., Helmkamp, G. M. and Yarbrough, L. R. (1989). Isolation and sequence of cDNA clones encoding rat phosphatidylinositol transfer protein. *J. Biol. Chem.* **264**, 16557–16564.
- Dupont, J., Graybill, J. R., Armstrong, D., Laroche, R., Touze, J. E. and Wheat, L. J. (1992). Fungal infections in AIDS patients. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**, 19–28.
- Fonzi, W. A. and Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717–728.
- Gil, C., Pomés, R. and Nombela, C. (1988). A complementation analysis by parasexual recombination of *Candida albicans* morphological mutants. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1587–1595.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. H. and Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.* **198**, 179–182.
- Glover, D. M. (Ed.) (1985). *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I. IRL Press, New York.
- Goshorn, A. K. and Scherer, S. (1989). Genetic analysis of prototrophic natural variants of *Candida albicans*. *Genetics* **123**, 667–673.
- Herreros, E., García-Sáez, M. I., Nombela, C. and Sánchez, M. (1992). A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation. *Mol. Microbiol.* **6**, 3567–3574.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163–168.
- Lee, K. L., Buckley, H. R. and Campbell, C. C. (1975). An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **13**, 148–153.
- Lopez, M. C., Nicaud, J. M., Skinner, H. B. *et al.* (1994). A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form. *J. Cell Biol.* **125**, 113–127.
- Meyhack, B., Bajwa, W., Rudolph, H. and Hinnen, A. (1982). Two yeast acid phosphatase structural genes are the result of a tandem duplication and show different degrees of homology in their promoter and coding sequences. *EMBO J.* **1**, 675–680.
- Navarro-García, F., Pérez-Díaz, R., Magee, B. B., Pla, J., Nombela, C. and Magee, P. T. (1995a). Chromosome reorganization in *Candida albicans* 1001 strain. *J. med. Vet. Mycol.* **33**.
- Navarro-García, F., Sánchez, M., Pla, J. and Nombela, C. (1995b). Functional characterization of the *MKCI* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2197–2206.
- Novick, P., Field, C. and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205–215.
- Ohashi, M., Vries de, K. J., Frank, R. *et al.* (1995). A role phosphatidylinositol transfer protein in secretory vesicle formation. *Nature* **377**, 544–547.
- Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444–2448.
- Polaina, J. and Adam, A. C. (1991). A fast procedure for yeast DNA purification. *Nucl. Acids Res.* **19**, 5443.
- Salama, S. R., Cleves, A. E., Malehorn, D. E., Whitters, E. A. and Bakaitis, V. A. (1990). Cloning and characterization of *Kluyveromyces lactis* SEC14, a gene whose product stimulates Golgi secretory function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**, 4510–4521.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (Eds) (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467.
- Skinner, H. B., McGee, T. P., McMaster, C. R., Fry, M. R., Bell, R. M. and Bankaitis, V. A. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein effects a ligand-dependent inhibition of choline-phosphate cytidylyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 112–116.
- Tanaka, S. and Hosaka, K. (1994). Cloning of a cDNA encoding a second phosphatidylinositol transfer protein of rat brain by complementation of the yeast *sec14* mutation. *J. Biochem. (Tokyo)* **115**, 981–984.

Understanding *Candida albicans* at the Molecular Level

J. PLA, C. GIL, L. MONTEOLIVA, F. NAVARRO-GARCÍA, M. SÁNCHEZ AND C. NOMBELA*

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

Received 14 August 1996

CONTENTS

Introduction	1677
Classical genetics	1679
Mutant isolation	1679
Parasexual genetics	1679
<i>C. albicans</i> karyotype variability	1680
Nomenclature of chromosomes	1680
Karyotype modifications	1680
Remarks	1681
Development of a transformation system in <i>C. albicans</i>	1681
<i>C. albicans</i> transformation	1681
Integrative transformation	1682
Autoreplicative vectors	1683
General strategies for isolation of <i>C. albicans</i> genes	1684
Isolation using <i>S. cerevisiae</i> or <i>C. albicans</i> as the genetic host	1684
Isolation based on DNA sequence homology	1685
Other strategies	1686
Gene disruption strategies	1686
Development of a gene reporter system	1689
Conclusions	1690
Acknowledgements	1691
References	1691

INTRODUCTION

Candida albicans is a dimorphic pathogenic fungus frequently encountered as a commensal of the human digestive system and vaginal tract. *C. albicans* infections have increased dramatically during the last two decades due to several factors such as immunosuppressive treatments, long-term catheterization, broad-spectrum antibiotic use and

longer survival of immunologically compromised individuals.^{5,63,71,214,231,299} The infections produced range from the superficial to the systemic. The latter type is mainly observed in individuals with immunological deficiencies and represents an important clinical problem. Although other promising targets are being explored by pharmaceutical industries,^{56,78,99} the therapeutic arsenal currently available in clinical practice is mainly limited to members of the polyene and azole families.^{79,80} In some cases, these antibiotics suffer from low specificity (which often results in important side-effects) and inadequate pharmacokinetics. Furthermore, the development of antifungal resistance^{21,109,201,243,248,297} is clearly pointing towards the necessity of finding new antifungal targets.^{198,295}

Another interesting feature of *C. albicans* is its ability to grow in at least two different morphological forms, either as a mycelium or as a yeast cell (Figure 1). Such a transition is induced in response to several environmental conditions, such as the pH or temperature, or different compounds, such as N-acetylglucosamine, proline or serum. *C. albicans* is therefore called dimorphic, although other additional morphological forms have also been found.²⁰⁰ In addition to the intrinsic biological interest of this differentiation program, the ability to switch between a yeast and a hyphal mode of growth is suspected to contribute to its pathogenicity.^{53,202,242} Some mutants altered in the ability to carry out this change have a reduced virulence, while others are still virulent.^{81,242}

For the above reasons, the importance of *C. albicans* as a model of pathogenic yeast has increased in recent years. However, the development of molecular genetics in *C. albicans* was largely hampered by its diploid nature and absence of a sexual cycle.^{200,258,262} The pioneer

*Corresponding author.

This article is dedicated to our children for all the time devoted to *C. albicans* and not to them.

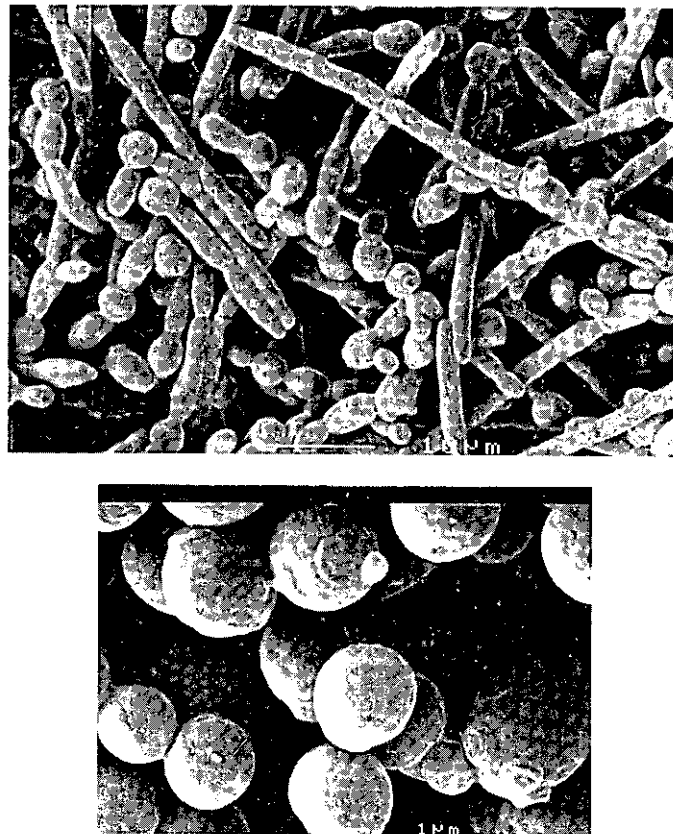


Figure 1. Morphology of *Candida albicans*. Scanning electron microscopy of *C. albicans* cells. In (A), the appearance of filaments obtained after induction of stationary phase cells with serum for 5 h at 37°C is shown, while in (B), vegetative yeast-like cells are shown.

work of some laboratories led in the 1980s to the development of mutant strains and parasexual genetics, while the development of integrative and autoreplicative vectors^{142,143} first enabled its molecular genetic manipulation. Now, almost 10 years later, there are many more groups interested in this field, and there has been an enormous increase both in the number of publications on *C. albicans* molecular biology and in gene sequences deposited in international data libraries. As an example, 93% of the *C. albicans* 174 sequence entries in the EMBL Gene Bank (July 1996) were deposited after 1990. *Saccharomyces cerevisiae* has been shown to be an excellent model organism in *C. albicans* research, since many *C. albicans* genes were shown to be expressed in this genetically malleable microorganism. It is, however, still necessary to develop

many genetic tools that facilitate molecular approaches with this pathogenic yeast.

There are a number of excellent reviews about *C. albicans* biology and genetics.^{144,145,147,164,228,258} In addition, a very useful WWW Server on *C. albicans* Research (<http://alces.med.umn.edu/candida.html>) has been created by Dr Scherer (University of Minnesota, MN, USA), in which *C. albicans* genetics, physical mapping, sequence data and other useful *C. albicans* resources are constantly updated. In this review we will first briefly summarize the work on classical genetics (mutant isolation, parasexual genetics and chromosomal reorganization), and then concentrate on some of the general strategies for gene isolation and the molecular tools being developed in *C. albicans*, e.g. transformation systems, gene disruption strategies and gene reporter systems.

CLASSICAL GENETICS

C. albicans classical genetics has played a very important role during last decade and may still be useful for performing some kinds of genetic analyses.¹⁴¹ As there are some comprehensive reviews dealing with this subject,^{164,222,227,258} which should be consulted for more depth, we will concentrate only on those results that are more relevant for the understanding of *Candida* genetics, although more recent data will also be included.

C. albicans diploidy was deduced from the determination of DNA content²⁰³ and the kinetics of reassociation of denatured total DNA.²³² In addition, it was found that many clinical isolates of *C. albicans* displayed a strongly biased spectrum of auxotrophic mutants following ultraviolet (UV) light irradiation,^{305,307} a fact that was interpreted as the consequence of the natural heterozygosity of many *C. albicans* strains for some loci and the induction of mitotic crossing-over by UV irradiation. This hypothesis was confirmed later from the analysis of either sectorized colonies, obtained after UV treatment of putative natural heterozygotes, or revertants of mutants isolated by chemical mutagenesis.^{224,226,305,308}

Mutant isolation

The diploid nature of *C. albicans* explains the difficulties in mutant isolation, since most mutant alleles are recessive and a mutant phenotype should therefore be homozygous in order to be expressed. After mutagenesis of a *C. albicans* wild-type strain (+/+), a mutant heterozygote strain (+/-) is generated, which must be rendered homozygous (-/-) by spontaneous or induced (mainly with the use of UV irradiation) mitotic recombination. Alternatively, another mutagenic treatment on the heterozygote could produce an apparently homozygous state by generating a second mutation in the remaining wild-type allele.

A number of different mutagenic agents have been used to obtain *C. albicans* mutants; the most common being UV irradiation, N-methyl-N-nitrosoguanidine, ethylmethane-sulfonate and nitrous acid.^{127,128,225,253} Several mutant enrichment procedures for auxotrophs were developed, like the ones based on amphotericin B treatment,²²⁴ inositol starvation⁵¹ and folate pathway inhibitors.¹⁰² In addition, morphological mutants were isolated using differential enrichment techniques based on filtration.^{30,84}

Using these procedures, a wide range of nutritional auxotrophs were isolated (including amino-acid, purine, pyrimidine and vitamin auxotrophs).²²² Mutants resistant to drugs and other growth inhibitors like nalidixic acid,⁹⁸ 5-fluorocytosine,³⁰² nikkomycin Z,³¹⁷ bacilysin,²⁰⁶ polyenes,^{23,110,137,212} cerulenin,¹¹¹ azoles,^{110,243} caffeine²⁵³ and vanadate¹⁶⁷ have also been obtained. In addition to these processes, colonial variants of *C. albicans*,^{119,241,267} morphological mutants unable to produce hyphae,^{30,64,112,199} mycelial and pseudomycelial mutants^{84,116,220} and mutants affected in cell wall^{208,265} and plasma membrane functionality^{212,264} have been obtained. Other types of mutants include those altered in proteinase secretion,¹⁴⁹ mitochondrial function,^{7,97} cytochrome P-450 function,^{10,215} galactose assimilation,⁹² chitinase production¹²⁵ and absence of certain surface determinants.^{34,303}

Although molecular protocols have replaced classical mutant isolation in *C. albicans*, these mutants may provide a source of host strains for the direct cloning of genes in *C. albicans*, as was the case for auxotrophic mutants,^{93,194,216} and especially in those processes where *S. cerevisiae* and *C. albicans* are clearly different.

Parasexual genetics

Protoplast fusion of *C. albicans* has been widely used^{11,83,94,127,176,211,225,256} and all published protocols are very similar, involving the use of calcium salts and polyethylene glycol.

Protoplast from strains to be analysed that present appropriate markers (normally auxotrophic markers) can be fused to produce hybrids selected in a medium that does not allow the growth of parental strains. Two kinds of colonies thus appear on the regeneration plates: fast-growing stable colonies that correspond to uninucleate tetraploid hybrids (probably resulting from the nuclear fusion of both parental strains) and slow-growing multinucleate colonies or heterokaryons that are unstable on complete medium.²⁵⁶ On selective medium, these slow-growing colonies develop faster-growing sectors that could be tetraploids or aneuploids.^{254,255,257} Hybrids are stable; however, the loss of chromosomes to restore the diploid state can be induced by heat-shock treatment¹⁰⁷ or using methyl benzimidazole carbamate, which interferes with microtubule functionality.¹¹ Therefore a full parasexual cycle of *C. albicans* can be induced ($2n \times 2n \rightarrow 4n \rightarrow 2n$).

Spheroplast fusion has allowed the characterization of important processes in *C. albicans*, such as adenine biosynthesis,^{51,226} 5-fluorocytosine, cerulenin and echinocandin resistance^{141,176,301,302,306} and the dimorphic^{83,84,199} and white-opaque transitions.^{44,268} Another application of the parasexual genetic system has been the performance of linkage analysis^{107,223,224,226} and at least five linkage groups were defined (reviewed by Poulter²²²) prior to the development of physical maps (see below). The parasexual system can also be applied to characterize clinical isolates.⁹⁴

Therefore, in spite of the important development of molecular genetics, which will be described in this paper, parasexual genetics can still contribute to *C. albicans* genetic research.

C. ALBICANS KARYOTYPE VARIABILITY

C. albicans chromosomal reorganization may represent an important alternative mechanism of genetic variability in a diploid organism that cannot use meiotic recombination. *C. albicans*' unstable genome is well documented, as well as the karyotypic differences between strains and isolates that were observed from the first analyses.^{8,123,178} Initially, the *C. albicans* karyotype was estimated to comprise a range of 7 to 14 bands.^{123,161,168,178} Since 1990, much effort has been expended to describe and understand the genome of *C. albicans*.²⁵⁸ In the last 5 years, data favouring the idea of 16 functional units (eight pairs of homologous chromosomes)^{61,123,151,294,312} and approximately 33 Mbp of genomic DNA⁴³ have accumulated. Using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) techniques such as CHEF, FIGE, TAFE, OFAGE or RGE,²⁷ as well as Southern blotting to assign genes and probes to the bands separated by electrophoresis, it was possible to construct a simple linkage map.^{123,161,294,312} A real physical and genetic map of *C. albicans* chromosomes was obtained later through the electrophoretic separation of fragments generated using the rare-cutting endonuclease *Sfi*I. Probes and genes were assigned to these *Sfi*I fragments and these fragments to each chromosome, conforming a complete map of two *C. albicans* strains, 1006 and the highly karyotypically reorganized WO-1.⁴³ The importance of these *Sfi*I fragments is shown by the fact that other strains such as 1012, FC18 or 1177 (the parental strain of 1006 used in the *C. albicans* mapping project developed at Minnesota University⁴¹) show similar *Sfi*I digestion patterns.⁴³ Furthermore,

these data have allowed the construction of physical maps of other strains.¹⁹¹ However, to date, the involvement of *Sfi*I fragments in genome reorganization has only been shown for strain 1183.¹²

Nomenclature of chromosomes

Chromosomes in *C. albicans* are named using a numbering system established at the first ASM Conference on *Candida* and candidosis in 1987. It labels them from 1 (largest chromosome) to 7 (smallest chromosome),¹⁶² with chromosomes bearing the ribosomal DNA (rDNA) cluster labelled as R. Deviations from this 'standard' chromosome pattern are numbered in the following way: chromosomes smaller than chromosome 7 are called *snc* (supernumerary chromosome)⁴⁴ and homologous chromosomes differing in size are denoted as .5 or with an asterisk (*).⁴³ Nevertheless, other authors preferred a distinct numbering system using letters (H to A),¹⁵¹ roman numbers (VIII to I)²⁴¹ or arabic numbers (8 to 1)²⁹⁴ or (1 to 8).^{40,42,61,123} In this work, we will use the ASM agreement (R to 7) to label the chromosomes of *C. albicans*.

Karyotype modifications

The reasons for *Candida* karyotype variations are largely unknown, but modifications can be attributed to selection of certain cell populations in different environments, such as new carbon sources,²³⁸ presence of antifungals²¹³ or, simply, different human body niches.¹³ Other karyotypic changes cannot be attributed to any particular reason and seem to arise spontaneously.^{240,288} The enormous karyotype variability among strains, and even among colonies from the same strain, has been the *leit motiv* of karyotype research, which tries to link these variations to changes in diverse phenotypic traits. Modifications of colonial and cellular morphology,^{230,239,241,288} antifungal susceptibility,²¹³ human infectivity,^{178,213} carbon source assimilation^{238,312} and virulence in mice¹⁴⁸ have shown some relationship with the reorganization of the chromosomes, but they do not explain it completely. SC5314 (the parental strain of CA14, currently involved in a sequencing project) seems to have a larger chromosome⁷⁰ (similar in size to the R₁ chromosome from WO-1 strain) not present in CA14 and other differences in an intermediate chromosome (F. Navarro-García; L. Monteoliva, unpublished observations). This example shows

that an alteration in the chromosome pattern could be due to the manipulations needed for molecular biology experiments and, apparently, may not implicate changes in phenotypic traits.

The main chromosomal alterations are the R chromosome size variation and recombination between non-homologous chromosomes.¹⁶² Size alteration in the R chromosome can be explained by the presence of rDNA, a factor that is involved in unequal crossing-over events during the mitotic cycle in *S. cerevisiae*^{280,292} and *Neurospora crassa*.^{233,236} As 87% of spontaneous *C. albicans* mutants show alterations in R chromosome size²³⁷ and 10% of the progeny of a cell can change the electrophoretic mobility of this chromosome after 15 generations due to variations in rDNA repeats,¹²¹ some authors do not consider these alterations to be important.²³⁸ Others, however, are able to show a correlation between high frequency morphology switching and the instability of the R chromosome.²³⁰

Recombination events between non-homologous chromosomes are not yet explained, but it is clear that chromosomes 2, 4 and 7 are the most unstable.^{43,122,230,294} Initially, several pieces of evidence pointed toward a relationship between RPSs (repeated sequences composed by sequence repeats (172 bp, *alt*) that contains small repeated fragments of 29 bp (COM29)) and karyotype variation. Some lines of evidence suggest that RPSs could act as 'recombination units' in *C. albicans*: first, RPSs are present in all chromosomes except in chromosome 3 (number 4 according to Chindamporn *et al.*⁴²), the most stable chromosome in the *C. albicans* genome; second, there are several *Sfi*I sites in the *alt* sequences and third, COM29 shows similarity to the λ attachment site and the site where DNA inversion/crossing-over takes place in bacteria, both being specific recombination sites.^{40,122} Recently, these authors suggested that RPS could function as a centromere due to its middle position in chromosome 5 (number 6⁴²), its similarity to the structure of sequences believed to be involved in centromeric functions in humans and its presence just once in each chromosome.⁴² Nevertheless, the possible relationship of *Sfi*I fragments with recombination events does not favour this idea, as DNA fragments near the centromere suffer less recombination than distal fragments.²²² In addition, RPS was unable to improve the stability of the *C. albicans* vector pMK22 in *C. albicans*.⁴²

Remarks

There are several reasons for developing a physical and genetic map of *C. albicans*. First, it can help to elucidate the structure of *C. albicans* chromosomes,^{41,175} still poorly understood, as well as to discover new elements that can stabilize extrachromosomal plasmids. Second, the study of reorganization between non-homologous chromosomes can shed light on the unknown field of mitotic recombination in *C. albicans*.^{40,42,43,122} Third, it represents a useful epidemiological tool in clinical surveys of infections, for instance the discrimination of new azole-resistant *C. albicans* strains in azole-treated immunocompromised individuals^{163,213} or even in distinguishing *C. albicans* from other *Candida* spp.⁸ Fourth, it will help to understand the real connection between chromosome rearrangements and phenotypic changes. Fifth, assignment of genes to chromosomes can help to improve the parasexual genetics of *C. albicans* and the development of specific clone libraries from each of the chromosomes.⁴⁴ Finally, it must be emphasized that physical and genetic mapping strategies are necessary prior to the total sequencing of the genome of an organism, as has been shown in the case of *S. cerevisiae*^{62,186} and *Homo sapiens*.^{118,177}

An additional advantage of the use of a 'standard' strain for molecular biology studies (like CA14,⁷⁰ which still lacks a complete map), would be to diminish the influence of karyotype modifications on phenotype. The isolation of *C. albicans* genes involved in DNA recombination⁶⁰ could lead to the development of strains with reduced karyotypic instability, an important task for future years in *C. albicans* genetics.

DEVELOPMENT OF A TRANSFORMATION SYSTEM IN *C. ALBICANS*

C. albicans transformation

The development of a genetic transformation system was one of the major goals to achieve in *C. albicans* genetic manipulation. We will focus both on the transformation procedure itself as well as the development of plasmid vectors, some of which are listed in Table 1.

Several strains have been used through the years as genetic hosts for autoreplicative or integrative transformation (see below). The most usual marker has been *ura3* found in SGY243,¹³³ 1006,⁹⁴ cMD716⁸⁸ or CA14.⁷⁰ There exist strains with

Table 1. *C. albicans* autoreplicative transformation vectors.

Name	ARS	Gene markers	Ref.
pRC3925	ARS2	<i>URA3, LEU2</i>	31
pCR2312	ARS2	<i>URA3, LEU2</i>	32
p1041	ARS1	<i>URA3</i>	93
p1110	ARS1	<i>URA3, ARG4</i>	93
p1109	ARS1	<i>URA3, ARG4</i>	93
p1113	ARS1	<i>URA3, LYS1</i>	93
p1334	ARS1	<i>URA3, LYS1</i>	93
pEH7	ARS3	<i>TCM1</i>	104
pCARS1	ARS1	<i>URA3</i>	132
pMK22	ARS1	<i>URA3</i>	143
pAN8	ARS2, ARS3	<i>ARG5,6</i>	194
pCB4	ARS2	<i>ADE1</i>	204
pRM1	ARS2, ARS3	<i>URA3, LEU2</i>	216
pRM10	ARS2, ARS3	<i>URA3</i>	216

Note: ARS sequences are numbered chronologically, therefore, ARS1 refers to the CARS sequence isolated by Dr M. Kurtz,¹⁴³ ARS2 to ARS obtained by Dr R. Cannon³² and ARS3 to Dr E. Herreros.¹⁰⁴

other markers such as *ade2* (SGY129,¹³³ hOG300²²⁶) or, very recently, *arg5,6* (CNC44¹⁹⁴). Strains bearing double markers are not common but a few have been described, such as SGY484 (*ura3 leu2*),¹³² 792-WC3 (*ura3 ade2*)⁸⁸ and RM1000 (*ura3Δ his1Δ*).¹⁹⁴ Strains with more than two auxotrophic markers are 1006 (*ura3 lys1 arg4 ser57 MPAl*),⁹⁴ 1161 (*ura3 lys1 arg4 ser57 gall MPAl*)⁹³ and CNC43 (*ura3Δ his1Δ arg5,6Δ*).¹⁹⁴

Protoplast formation using the cell wall lytic preparations zymolyase or glucylase is the most common and efficient transformation system used in *C. albicans* genetics. The procedure used is essentially similar to the one used in *S. cerevisiae*,¹⁰⁸ with several minor modifications.^{31,93,104,142,144} *C. albicans* protoplasts (or more accurately, spheroplasts) are normally prepared from exponentially growing cells, since the cell wall from stationary phase cells is more resistant to lytic enzymes and requires longer digestion periods. In some cases, an expression period after DNA entry prior to pouring on selective plates has been included to allow efficient expression of resistance genes;¹⁰⁴ this step seems to be unnecessary when complementing nutritional deficiencies. The stronger nature of *C. albicans* spheroplasts, able to regenerate directly on the surface of agar plates supplemented with osmotic support, probably reflects the stronger nature of the *C. albicans* cell wall

and the fact that complete protoplast formation is not necessary to achieve competence. Electroporation, despite its recombinogenic nature,¹⁰⁶ is widely used in *S. cerevisiae* genetics.¹⁶ While it is possible to use electroporation in gene disruption methods,^{26,204,289} the efficiencies achieved are much lower (10- to 100-fold) than those obtained with protoplast formation. Combined protocols involving partial protoplast formation and electroporation—already described in *S. cerevisiae*¹²⁹ and other fungi³⁵—increase significantly the efficiency of electroporation of intact cells.³ Lithium chloride^{120,260} was initially considered to be largely ineffective in *C. albicans*. The development of distinct modifications⁸² have, however, enabled its use in *C. albicans* gene disruption^{88,155} (a detailed protocol by D. Sanglard is available on the *C. albicans* Server). It presents the advantage of using intact cells and the number of transformants obtained is sufficient for many purposes. The use of conjugation^{100,101} or glass beads-mediated transformation⁵² has not been reported.

Integrative transformation

Integrative transformation was first described by Kurtz. Using a plasmid bearing the *C. albicans* *ADE2* gene, homologous recombination was forced with integration of plasmid sequences in *C. albicans* hOG300 genome.¹⁴² Since then, many groups have used integrative transformation.^{17,20,31,70,88,92,95,133,144,193,194,251} Despite its low transformation frequencies (0.5 to 10 transformants/μg DNA, depending on the strain and method used), this system is preferred for the introduction of stable genetic traits. This system has even been used recently in library screening in *C. albicans*²⁵ to search for genes involved in the dimorphic process.

There are no systematic reports on factors influencing recombination in *C. albicans*. Although homologous recombination is frequent, non-homologous recombination can also take place, resulting in integration of the DNA at different locations in the genome. The transformation methodology used, the specific gene localization and the size of flanking recombination regions are suspected to play a role. It is also possible that, similar to *Candida glabrata*,⁴⁸ the amount of DNA used in the transformation influences the final DNA destination within the cell, with a tendency to integrate at non-homologous sites when using an excessive amount of DNA. It has been reported that

integration at the white-specific locus *WH11* is 4.5 to 7 times more frequent in white *versus* opaque spheroplasts, while integration at an opaque gene, *PEP1*, is 30 times more frequent in opaque spheroplasts. The frequency of homologous integrative transformation, thus, also seems to correlate with the transcriptional state of a particular gene.²⁷⁷

Autoreplicative vectors

While integrative transformation is an important tool for the generation of stable transformants and the development of gene disruption strategies, an autoreplicative transformation system is desirable given its superior versatility in DNA recovery and library screening. The absence of natural plasmids similar to the *S. cerevisiae* 2 μ plasmid, in *C. albicans*, and the fact that *S. cerevisiae* 2 μ -derived sequences do not promote autoreplicative transformation in *C. albicans*, has led to the use of a common strategy previously developed in other fungal systems for the isolation of Autonomously Replicating Sequences (ARS). These sequences are supposed to represent chromosomal replication origins on the basis of their subcellular localization (nuclei), temporal replication (S phase) and spacing in chromosomes (30 to 40 kb in *S. cerevisiae*).¹⁹⁶ In any case, they are defined as a DNA sequence which, when present on plasmids, allows their autonomous replication and increases the frequency of transformation two to four orders of magnitude.^{115,281,282} Transformants bearing ARS-containing vectors can be identified on the basis of their tendency to lose the marker in the absence of selective pressure (mitotic instability) and their maintenance as non-integrated free plasmids able to be recovered upon transformation in other microbial cells (normally *Escherichia coli* cells).

The first described ARS sequence (called CARS) was isolated by Kurtz and colleagues.¹⁴³ These authors constructed a *C. albicans* gene library on a pBR322-derived vector containing the *ADE2* marker that was screened in a *C. albicans ade2* strain, looking for clones fulfilling the two criteria described above. This led to the identification of a 0.35 kb *RsaI* fragment, which increased the frequency of transformation up to 10³ transformants/ μ g of DNA. Plasmids containing this ARS frequently multimerized as head-to-tail repeats¹⁴³ that gave rapidly growing transformants, suggesting an inefficient initiation of replication and/or segregation of non-multimerized plasmids.

An increase in the size of extrachromosomal sequences may improve their mitotic stability, as described in *S. cerevisiae*.¹⁰⁵ Vectors based on this ARS have been used to transform *C. tropicalis*.²⁴⁷

Shepherd's group described the isolation of a second ARS (here called ARS2) through its replicative properties in the heterologous host *S. cerevisiae*.³¹ The frequency of transformation obtained with these plasmids is about 10³ transformants/ μ g DNA, similar to CARS-derived plasmids. Two kinds of transformants were obtained: integrative transformants, with seven to eight copies per diploid genome and replicative transformants, with two to three copies per cell. The usefulness of these plasmids was demonstrated by the construction of derivatives containing the *C. albicans ADE2* and *APrA* genes.³² In addition to their replicative properties in *C. albicans*, these plasmids were also able to replicate in *S. cerevisiae*, maintaining 10–15 copies per haploid genome.³²

Using a similar strategy, Herreros *et al.* isolated a third sequence promoting replicative transformation, using the *S. cerevisiae* integrative vector YIp5 and the *S. cerevisiae URA3* marker.¹⁰⁴ This ARS activity (here called ARS3) was confined to a 687 bp fragment in which four 11 bp consensus sequences¹⁹⁶ were found. Plasmids bearing this fragment were also able to replicate in *S. cerevisiae* as well as *C. albicans* cells. The frequency of transformation was about 10³ transformants/ μ g DNA. An interesting property of this ARS is its capability to promote autonomous replication without the formation of multimers that need to be resolved by *S. cerevisiae* transformation.⁹³ Recently, a new set of plasmids has been obtained in which these last two ARS elements have been joined in a single vector. These plasmids do not significantly increase the overall transformation frequency but they increase the copy number and stability, thus facilitating the use of *C. albicans* as genetic host in direct gene cloning.²¹⁶ Similar synergistic effects of two copies of an ARS sequence have been described for the weak *S. cerevisiae* rDNA ARS.¹³⁹ Although heterologous ARSs in *S. cerevisiae* are not functional in many cases,^{126,172,196} the plasmids based on *C. albicans* ARS2 and/or ARS3 replicate in *S. cerevisiae*, thus adding versatility to their use in cloning experiments.

It must be stated that the development of a transformation system using a dominant selectable marker is an important goal in order to efficiently manipulate wild-type strains devoid of nutritional

Table 2. *C. albicans* libraries in *S. cerevisiae* cloning vectors.

Vector	<i>C. albicans</i> genomic DNA source (treatment)	Ref.	Some cloned genes
YEp24	CBS562 (ATCC18804) <i>Bam</i> HI, partially or totally digested	4	<i>HIS4</i> , ⁴ <i>PTR2</i> ¹⁴
YEp352	WO-1 (partial <i>Sau</i> 3AI)	22	<i>CEK1</i> ³¹¹
YEp24	C792 (partial <i>Sau</i> 3A)	59	<i>EF-3</i> ⁵⁹
YEp13	SC5314 (partial <i>Sau</i> 3A)	85	<i>URA3</i> , ⁸⁵ <i>TRP1</i> , ²⁰⁴ <i>ADE2</i> , ¹⁴² <i>LIG1</i> , ¹⁵ <i>ERG7</i> ¹³⁴
pYSK35	B792 (ATCC36803) (partial <i>Sau</i> 3A)	69, 266	<i>ENO1</i> , ¹⁷¹ <i>TS</i> , ²⁶⁶ <i>BEN^R</i> (<i>MDR1</i>) ⁶⁹
pRS202	1006 (partial <i>Sau</i> 3A)	155	<i>CPH1</i> , <i>CPH2</i> ¹⁵⁵
YRp7	ATCC10231 (partial <i>Sau</i> 3A)	158	<i>ACT1</i> , ¹⁵⁷ <i>URA3</i> , ¹⁵⁸ <i>INO1</i> , ¹³⁶ <i>SAP1</i> ¹¹⁷
pEMBL Y-23	WO-1 (partial <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III)	161	<i>KRE1</i> , ²² <i>ArDH</i> , ³¹⁴ <i>PMA1</i> ¹⁸¹
pEMBL Y-23	WO-1 (partial <i>Sau</i> 3A)	164	
YEp352	1001 (partial <i>Sau</i> 3A)	193	<i>MKCI</i> , ¹⁹³ <i>SEC14</i> , ¹⁸³ <i>HOG1</i> ²⁴⁶
pYE Ura3	1001 (partial <i>Sau</i> 3A)	192	<i>HIS4</i> ¹⁹²
YRp7	ATCC26555	197	<i>SEC18</i> ¹⁹⁷
YEp13	B792 (ATCC36803)	235	<i>ARO3</i> , ²⁰⁹ <i>RBPI</i> , ⁶⁸ <i>PDE1</i> , ¹¹³ <i>CDC25</i> , ⁸⁷
			<i>CDC3</i> , <i>CDC10</i> ⁵⁸
YEp24	124 (partial <i>Sau</i> 3A)	263	<i>CDC28</i> ²⁶³
YCp50	ATCC10261 (partial <i>Sau</i> 3A)	269	<i>PMM1</i> , ²⁶⁹ <i>PKC1</i> , ²⁰⁵ <i>PMI1</i> , ²⁷⁰ <i>TEF3</i> ⁴⁷
YEp351	IFO1060 (partial <i>Sau</i> 3AI)	283	<i>CHS1A</i> , ²⁸⁴ <i>CHS3</i> ²⁸³

markers. *C. albicans* is normally resistant to many of the substances normally used for selection in other types of cells, such as G418 or hygromycin B (cited in Kurtz *et al.*¹⁴⁴) or sulphamides (J. Pla, unpublished observations). The only dominant selection system described so far¹⁰⁴ made use of a trichodermin resistance ribosomal *TCM1* gene.⁷⁴ Its structural (ribosomal) and not enzymatic nature required significant levels of expression to confer resistance (8 µg/ml) using autoreplicative vectors. Mycophenolic resistance, which has recently been characterized,¹⁴⁰ may be another useful dominant marker.

The studies described above indicate different global features concerning ARS-derived plasmids (Table 1). These plasmids are normally present in a low copy number (still far from the copy number obtained with the *S. cerevisiae* 2 µm plasmid) and can multimerize or recombine with the genome leading to difficulties in genetic analyses. It is clear that more efforts are still required towards the construction of suitable plasmid vectors. The fact that plasmids based on ARS2 and/or ARS3 replicate in *S. cerevisiae* simply reflects the way they were isolated (in a heterologous host), but the isolation of a novel *C. albicans* ARS in *C. albicans* may allow identification of highly efficient sequences. In addition, novel genetic elements (telomeres, centromeres or other stabilizing DNA

sequences) could be isolated using this approach. The isolation of centromeres has, so far, been unsuccessful in *C. albicans*. However, the construction of improved plasmid vectors is an important task for the development of more versatile *C. albicans* genetic tools in the future.

GENERAL STRATEGIES FOR ISOLATION OF *C. ALBICANS* GENES

Isolation using S. cerevisiae or C. albicans as the genetic host

Complementation is one of the most frequent strategies for gene isolation in *C. albicans*. It presents the advantage of leading to the isolation of a functional genetic element and allows the characterization of a particular phenotype. *C. albicans* genes are normally expressed in *S. cerevisiae*, although the inverse is not normally true.¹⁴⁴ It is therefore not surprising that many genes have been isolated through the use of *S. cerevisiae* as a genetic host and gene libraries prepared in *S. cerevisiae* vectors (Table 2). It was first thought that only highly functionally conserved nutritional genes could be isolated using this approach. However, in addition to nutritional and other metabolic biosynthetic genes,^{4,85,113,134,136,142,207,235,266} genes involved in

carbon assimilation,¹³¹ peptide transport,^{14,159} drug resistance,^{18,69,229} DNA metabolism,^{6,15} cell cycle,^{87,263} signal transduction,^{46,155,193,246,311} protein secretion^{183,197} and other cellular processes have been isolated using this procedure. The existence of a defined *S. cerevisiae* mutant is, then, a helpful genetic tool to isolate the corresponding *C. albicans* homologue. However, *S. cerevisiae* wild-type cells can be used as hosts in genetic screening, based on the overexpression of a defined gene product, which allow the identification of novel phenotypes in the heterologous host such as multidrug resistance⁶⁹ and pathogenic determinants such as adhesion or invasion, among others.

Complementation of *E. coli* mutants has been a successful approach to the cloning of *C. albicans* genes in some cases. The isopropylmalate dehydrogenase (*LEU2*)¹²⁴ and the dihydrofolate reductase gene⁷² have been isolated using this approach. The *C. albicans* *URA3* gene also complements the *E. coli* *pyrF* mutation,⁸⁵ but, for example, *C. albicans* *HIS1* does not complement a *hisG* mutation.²¹⁶ The availability of a large number of *E. coli* mutants⁹ and its ease of manipulation makes this an attractive and straightforward approach. However, it is not a generally useful system due to the lack of expression of *C. albicans* genes in *E. coli* and could require the development of suitable *C. albicans* cDNA libraries in prokaryotic vectors.

Although it is evident that *S. cerevisiae* is an excellent shuttle organism for *C. albicans* genetics, not all *C. albicans* functions could be analysed in this species. Two examples are the dimorphic transition and pathogenicity. *S. cerevisiae* can grow invasively on certain nitrogen-starved media⁸⁶ and some genes involved in the mating pathway also take part in this differentiation program.¹⁵⁶ In fact, in *C. albicans*, homologous genes play a role in hyphal formation.¹⁵² However, when this route is blocked in *C. albicans*, the cells are still able to induce hyphal formation in response to serum,¹⁵⁵ thus indicating the existence of additional pathways promoting hyphal formation which, to date, have not been found in *S. cerevisiae*. Also, although certain *S. cerevisiae* strains may be virulent in certain experimental models,^{28,174} it is generally regarded as a safe non-pathogenic yeast (GRAS). Using this approach, the isolation of *C. albicans* genes involved in virulence could be difficult or even impossible. The white-opaque transition is another interesting process whose analysis must be undertaken in *C. albicans*.^{272,273}

From the analyses of the cloned genes to date, slight differences can be found between *C. albicans* and *S. cerevisiae* in some features. For example, in addition to deviation from the standard genetic code (see below), the codon usage is different.²⁴ The existence of introns in *C. albicans* genes is not frequent, similar to the situation in *S. cerevisiae*, and the presence of introns is not necessarily conserved between homologous genes.¹⁸³ Introns have been found in the genes for actin (*ACT1*),¹⁵⁷ β -tubulin *TUB2*,²⁷¹ calmodulin (*CMD1*)²⁵² and the *DMC1/LIM15* meiosis-related homologue *DLH1*.⁶⁰ From these studies, it appears that *C. albicans* introns are small in size and share similar 5', 3' and branchpoint consensus sequences to those present in *S. cerevisiae* genes,³¹⁵ although some minor differences can be found.⁶⁰ From the analysis of the *C. albicans* genes cloned to date, it seems that many genetic regulatory signals (promoter consensus sequences, transcriptional termination signals and others) are fairly conserved between these two organisms. It must be noted, however, that a detailed analysis of regulatory genetic signals has not been carried out in *C. albicans* genes, and most of them have been identified from their homology with the *S. cerevisiae* counterparts and not by their functionality in *C. albicans*. Apart from its basic interest, identification of the peculiarities of *C. albicans* molecular genetics could find applications in several areas, such as the development of novel antifungals.¹⁵³

Finally, it should be stated that the development of a direct cloning system in *C. albicans*, with suitable gene libraries (Table 3) and host strains, is an important goal in *C. albicans* genetics. This is particularly evident since, to date, only nutritional genes have been isolated directly using *C. albicans* as genetic host.^{93,216} The availability of gene libraries in *C. albicans* autoreplicative vectors,²¹⁶ as well as the availability of several *C. albicans* mutants altered in important physiological processes, may allow exploitation of this approach.

Isolation based on DNA sequence homology

Cloning of *C. albicans* genes through hybridization with homologous DNA probes is a second very successful approach. Libraries based on *S. cerevisiae*, *C. albicans*, λ phage and other prokaryotic vectors are useful for this purpose (Tables 2-4). It is not limited to genes sharing a high degree of homology at the DNA level, like actin (*ACT1*) and β -tubulin (*TUB2*)^{157,271} but has also been used

Table 3. *C. albicans* libraries in *C. albicans* vectors.

Vector	<i>C. albicans</i> genomic DNA source	Gene marker	Ref.	Some cloned genes
pI041 (YpB1041)	655	<i>URA3</i>	93	<i>CDC9</i> , ⁶ <i>ARG4</i> , <i>SER57</i> , <i>LYSI</i> ⁹³
pCARS1	SC5314	<i>URA3</i>	132	
pAN8	1001 (ATCC 62354)	<i>ARG5,6</i>	195	
pRM1	1001	<i>URA3</i> , <i>LEU2</i>	216	<i>ARG5,6</i> , ¹⁹⁴ <i>HIS1</i> ²¹⁶
pRM100	1001	<i>URA3</i> , <i>HIS1</i>	217	

with other less homologous genes by appropriate modification of the stringency of hybridization.^{59,135,169,171,180,181,188,244,269,270,274,283,284,287} In fact, homology between *C. albicans* and *S. cerevisiae* genes is common, and, for example, over 90% of more than 200 *C. albicans* genes partially sequenced in a random genome sequencing project in the laboratory of Dr Scherer, displayed significant homology to an *S. cerevisiae* counterpart. However, human DNA probes have also been successfully used to isolate a *C. albicans* peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase¹³⁸ and an integrin-like protein.⁷⁵ This approach should be especially interesting for the isolation of members of gene families which may share DNA homology.

Other strategies

Immunological screening has been used in some cases.^{67,76,150,190,261,279,286} The nature and/or specificity of the antibody preparation (polyclonal, monoclonal, affinity purified, etc.) and the detailed technical protocol used in the screening strongly influence the final success of this approach. The availability of antisera prepared against different cell wall components makes this an attractive approach, and, in fact, it has been used recently to isolate clones expressing phase-specific antigens.²⁶¹ The large number of commercial antibodies available against proteins involved in many relevant processes (like membrane receptors) supports the potential of this strategy.

cDNA differential gene expression has been used in some cases^{20,77,184,251,278,291} and has shown to be a useful tool in the analysis of the dimorphic and white-opaque transitions, as well as in cell wall construction, among other cellular processes. The development of useful gene reporter assays, however, will enable the identification of differen-

tially expressed genes, and may complement this approach.

Protocols based on the polymerase chain reaction have been used on some occasions.^{60,173,210,310,316} This approach is particularly useful when conserved domains are present in homologous genes from other organisms. The enormous increase in the available gene sequence information may promote the use of this strategy in the future. However, it requires a second round of gene screening to isolate the full genomic clone, since only a probe is commonly obtained. Reverse genetics has also been used successfully.^{33,37,160,170}

Finally, it must be stated that the availability of powerful automatic sequencing methodologies is allowing the prosecution of random sequencing projects that may speed up our knowledge of *C. albicans* genes. Sequencing the entire *C. albicans* genome may be a technically achievable task in the near future and we believe that an international effort should be orchestrated for that purpose.

GENE DISRUPTION STRATEGIES

Gene disruption is an essential tool in host strain construction, gene mapping and functional analysis. The absence of a gene disruption system impeded, for a long time, the elucidation of the function of cloned *C. albicans* genes and therefore functionality studies were only carried out using *S. cerevisiae* as a genetic host.

Gene disruptions were first attempted in order to construct suitable host strains in gene transformation experiments. Dominant resistance markers were not available and the reversion frequencies of some of the markers present in strains was a major handicap in genetic transformation. Isolation of auxotrophs then involved the use of UV-enhanced

Table 4. *C. albicans* gene libraries in phage or prokaryotic vectors.

Vector	<i>C. albicans</i> DNA source	Ref.	Some cloned genes
λZAPII	SC5314, hyphal induced cDNA	20	<i>PHRI</i> , ²⁵¹ <i>ECEI</i> ²⁰
λEMBL4	A72, <i>Sau3A</i>	33	<i>HEXI</i> ³³
λEMBL4	ATCC10261	37	<i>EXGI</i> ³⁷
λGEM12	SC5314 partial <i>Sau3A</i>	39	<i>Tca1</i> ³⁹
λZAP	3153a, cDNA	55	<i>UBC4</i> , ⁵⁵ <i>CDKI (CDC28)</i> , <i>CYBI</i> ⁵⁴
λEMBL-3	stn-1 partial <i>Sau3AI</i>	57	<i>ARF</i> , ⁵⁷ <i>CBP</i> , ¹⁷⁰ <i>EBP</i> ¹⁶⁰
pUC18	10127/5 partial <i>Sau3AI</i>	72	<i>DHRF</i> ⁷²
λGEM12	KEMH5, partial <i>Sau3AI</i>	73	<i>ENO1</i> ⁷³
λEMBL3	ATCC10261, <i>Sau3AI</i>	75	<i>α-INT1</i> ⁷⁵
λgt11	SC5314, genomic sheared	76	Secretory acid proteinase ⁷⁶
Uni-Zap XR	ATCC32354, sucrose induced cDNA	77	<i>MAL2</i> ⁷⁷
Bluescript KS+	792-1, <i>EcoRI</i>	87	
pBR322	ATCC10261, <i>EcoRI</i>	124	<i>LEU2</i> ¹²⁴
pBR322	ATCC10261, <i>BamHI</i>	124	<i>LEU2</i> ¹²⁴
pBR322	ATCC10261, <i>HindIII</i>	124	<i>LEU2</i> ¹²⁴
λ590	SC5314, <i>HindIII</i>	135	<i>P450L1A1</i> ¹³⁵
λZAP	?, <i>EcoRI</i>	138	<i>CYP</i> ¹³⁸
λ590	SC5314 <i>EcoRI</i> , completely digested	304	<i>CEF-3</i> , ¹⁸⁸ <i>TEFI</i> , ²⁸⁷ <i>CPY</i> ¹⁸⁷
pSM7	SC5314, <i>RsaI</i>	143	<i>ARS1</i> ¹⁴³
λgt11	ATCC20955, yeast cDNA	150	<i>HSP70</i> ¹⁵⁰
EMBL	SC5314, partially <i>Sau3AI</i>	169	<i>ACPR (CPH1)</i> ¹⁶⁹
pUC18	ATCC10261, <i>HindIII</i> complete digestion	173	<i>CHT1</i> , <i>CHT2</i> ¹⁷³
pUC18	ATCC10261, <i>EcoRI</i>	173	<i>CHT3</i> ¹⁷³
λFixII	SS, partial <i>Sau3A</i>	180	<i>SAP1</i> , <i>SAP4</i> ¹⁸⁰
pBluescript	WO-1, partial <i>Sau3A</i>	180	<i>SAP1</i> , <i>SAP4</i> <i>CARE2</i> ¹⁸⁰
λEMBL3	C74 partial <i>Sau3A</i>	182	<i>SAP5</i> , <i>SAP6</i> , <i>SAP7</i> ¹⁸²
λgt11	WO-1 (opaque cDNA)	184	<i>Op4</i> ¹⁸⁴
λgt10	WO-1 (opaque cDNA)	185	<i>PEP1</i> ¹⁸⁵
λGEM12	SC5314 partial <i>Sau3A</i>	188	<i>CEF-3</i> ¹⁸⁸
λgt11	SC5314, cDNA	190	<i>NAG1</i> ¹⁹⁰
λgt11	4918, <i>EcoRI</i>	207	<i>PRSI</i> ²⁰⁷
λgt11	3153a, partial <i>EcoRI</i>	245	Ca7 (telomere) ²⁴⁵
λEMBL4	WO-1 <i>EcoRI</i>	244	<i>CAG1</i> ²⁴⁴
λZAPII	SC5314, germ-tubes induced cDNA	252	<i>CMD1</i> ²⁵²
λ1149	616, <i>EcoRI</i>	259	27A sequence ²⁵⁹
EMBL3	616, partial <i>Sau3A</i>	259	27A sequence ²⁵⁹
λgt11	ATCC26555, yeast cDNA	261	<i>ENO1</i> ²⁶¹
λgt11	ATCC26555, mycelial cDNA	261	<i>HSP70</i> ⁶⁷
pGEM9z(+)	WO-1, White, cDNA	278	<i>cWh11</i> ²⁷⁸
pGEM9z(+)	WO-1, Opaque, cDNA	278	
λZAP	SC5314, hyphal cDNA	286	<i>ENO1</i> ²⁸⁶
λZAPII	3153, mycelial cDNA	290	<i>PYKI</i> , <i>ADHI</i> , ²⁹⁰ <i>HSP90</i> ²⁸⁹
λFixII	?, partial <i>Sau3A</i>	293	<i>TOPI</i> ²⁹³
λ607	SC5314 <i>HindIII</i> , completely digested	145	<i>CEF-3</i> , ¹⁸⁸ <i>TEFI</i> , ²⁸⁷ <i>CPY</i> ¹⁸⁷
λZAPII	ATCC32354, mechanical fragmentation	313	<i>NMT1</i> ³¹³
λFix II	4918 <i>SalI</i>	318	<i>FAS1</i> ³¹⁸
λGEM11	B792, partial <i>Sau3AI</i>	38	<i>CHS2</i> ³⁸

mitotic recombination on a heterozygous strain (obtained through homologous recombination with an appropriate gene marker) to generate

homozygosity at the desired *locus*. In this way, Kelly *et al.* first achieved the disruption of the *C. albicans URA3* gene using the previously cloned

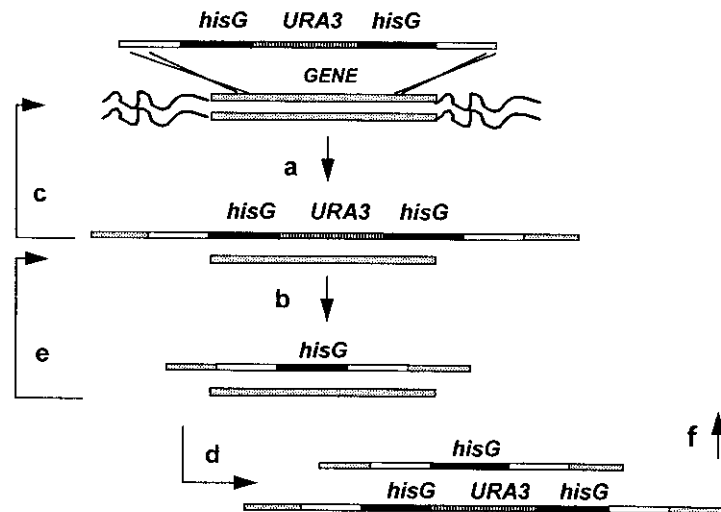


Figure 2. A gene disruption strategy in *Candida albicans*. Scheme of the now 'classical' strategy to obtain gene disruptions in *C. albicans*.⁷⁰ A construction is made either integrating or replacing a portion of the desired gene (*GENE*) with the *hisG*-*URA3*-*hisG* cassette. This construction is then used to replace the first copy of the *GENE* in one of the chromosomes (a). Non-homologous recombination can take place at this stage and the whole construct can be integrated elsewhere in the genome. Selection on 5-FOA plates allows recovery of a *GENE*/*genEA* heterozygote following intrachromosomal recombination between the flanking *Salmonella typhimurium hisG* genes (b) but, also, other recombination events can take place leading to the wild-type genotype (c). The same procedure must be repeated again to disrupt the second allele. Integration of the cassette into the remaining wild-type allele will generate a homozygous *genEA/genEA* mutant (d) while integration on the previously deleted allele will regenerate the heterozygous mutant (e). Recovery of the Ura⁻ phenotype can again be selected on 5-FOA plates (f). Multiple tandem integrations or non homologous recombination events are not represented. Adapted from Fonzi and Irwin⁷⁰.

ADE2 gene as selection marker.¹³³ This strategy is not restricted to nutritional biosynthetic genes, with an easy-to-check phenotype, and has, in fact, been used recently with the *C. albicans CAG1* gene.²⁴⁴ The red phenotype of *ade2* strains facilitated the genetic analysis, which involved the identification of red and white sectorized colonies. Kelly *et al.* later reported the construction of a double *leu2 ura3* auxotroph: the *LEU2* gene was disrupted with a foreign (λ -derived) DNA sequence and cotransformed with a CARS-*URA3*-containing vector as a genetic marker. Ura⁺ transformants were then selected and *LEU2* disruption was confirmed by Southern hybridization. The plasmid was subsequently lost in non-selective medium to recover the *ura3* auxotrophy¹³² and a mutagenic step with UV was used to mutate the remaining wild-type allele and isolate the desired *leu2 ura3* strain. The availability of strains with

two nutritional markers permitted the design of disruption strategies based on both markers, and therefore devoid of the random mutagenic processes inherent to UV irradiation.¹⁴⁶ Both copies of the *HEM3* gene were sequentially disrupted on the host strain *leu2 ura3* using the *LEU2* gene. This strain, however, required cotransformation with a CARS-*URA3*-containing vector to isolate Leu⁺ colonies due to the poor growth in media supplemented with uracil. Some minor modifications of these techniques have been used recently to disrupt the *C. albicans* phosphomannose isomerase gene encoded by the *PMI1* gene²⁷⁰ and the phosphoribosylanthranilate isomerase encoded by the *TRP1* gene.²⁰⁴

A major advance in *C. albicans* genetics was achieved recently when Fonzi and Irwin⁷⁰ successfully adapted a strategy already used in *S. cerevisiae*.² This, now common, disruption strategy in *C.*

albicans research involves the use of the *C. albicans* *URA3* gene flanked by the *Salmonella typhimurium* *hisG* genes to provide flanking recombination regions (Figure 2). Following homologous recombination at the first chromosomal allele, intra-chromosomal excision of the *URA3* marker is selected with the antimetabolite 5-fluororotic acid (5-FOA). These authors reported the disruption of the *URA3* gene with λ phage-derived heterologous DNA in the clinical isolate SC5314.⁸⁵ The Ura⁻ strains were then obtained through entirely molecular techniques, and are prone to genetic transformation. These authors also described the successful disruption of the *ECE1* gene (from Extent of Cell Elongation)²⁰ and introduced an 18-bp endonuclease recognition site to identify the chromosomal localization of the gene. A similar strategy had been described previously by Gorman *et al.* using a Gal⁻ strain and a construction in which the *GAL1* gene was flanked by the bacterial *cat* gene. Excision of *GAL1* was, similar to *URA3*, selected with the antimetabolite 2-deoxy-D-galactose.^{91,92}

Using the strategy of Fonzi and Irwin or slight modifications of this protocol, many other different genes have been disrupted.^{88,89,95,155,179,193,194,205,210,246}

For example, disruption of the second allele of the *PHR1* gene was carried out using a pop-in/pop-out strategy which involved recombination at the wild-type locus to generate a non-tandem duplicated repeat of *PHR1*, one wild-type allele and an adjacent mutated one.²⁵¹ Selection on 5-FOA plates allowed the desired *phr1* null mutant to be obtained. In some cases, rare recombination events—probably involving multimerization—have been shown to occur at a specific locus,⁹⁶ although the system still allowed the generation of null mutants.⁹⁵ In addition, this system is useful to assess the existence of multiple chromosomal locations of a defined gene.²²¹ An interesting feature, observed from the limited number of disrupted genes so far achieved, is that single deletion strains frequently display a partial phenotype with respect to the wild-type and null mutant strains,^{193,205,246} a gene dosage effect which could reflect the adaptation to the diploid state by *C. albicans*.

While the system described above is an essential tool for the analysis of gene function, a major problem arises when trying to verify the essentiality of a specific gene. Although *C. albicans* has some homologues of the *S. cerevisiae* mating genes,^{46,152,155,244} a sexual cycle has not been found and it is therefore not possible to use

sporulation for this purpose. Antisense mRNA has not been successfully used in *C. albicans*. Essentiality, then, is inferred from the failure to obtain null strains in most cases^{183,289} but, obviously, a positive proof is desirable. A strategy to circumvent this problem, and verify the functionality of the cloned gene, is to replace the remaining wild-type copy in the heterozygote with a mutated allele (thermosensitive, cold-sensitive or simply a defective allele). This strategy has been used for the myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase encoded by the *NMT1* gene,³⁰⁰ resulting in a myristate-dependent strain. A second strategy may involve rendering the remaining wild-type allele expression being dependent on a regulated promoter, which, in addition, allows analysis of the terminal phenotypes associated with a specific gene deletion. White-opaque regulated promoters,^{275,276} nutritional biosynthetic gene promoters,^{192,216} sugar assimilation promoters,^{26,77} or other metabolic promoters^{19,65} may be used for this purpose. Obviously, a highly regulated promoter, with a low level (ideally not detectable) background expression in the uninduced state is necessary for this purpose. The development of suitable host strains with different nutritional markers¹⁹⁴ may allow the use of a third strategy, which involves deletion of both alleles of a specific gene while maintaining the wild-type gene on an episomal plasmid. Plasmid loss can then easily be checked by suitable genetic markers on the plasmid or by counterselection. These above-mentioned strategies should find application in the near future.

DEVELOPMENT OF A GENE REPORTER SYSTEM

The development of a gene reporter system is an essential tool to study gene function/regulation. Although *C. albicans* genes have been used as gene reporters in *S. cerevisiae*,^{29,45} common gene reporters from other kinds of cells, (e.g. *E. coli* β -galactosidase (*lacZ*)^{218,234} or *Photinus pyralis* luciferase (*LUC*)^{1,298}) do not work in *C. albicans*,¹⁰³ even when *C. albicans* regulatory signals are used.^{103,154,275} The peculiar genetic code of some *Candida* species^{130,285,296,309} is an important—but not the unique—limitation to heterologous gene expression in *Candida*. In fact, a special t-RNA has been shown to be responsible in *C. albicans* for the unusual (and essential¹⁵³) decoding of CUG codons.^{249,250} It has therefore been necessary

to develop gene reporter assays based on genetically modified heterologous markers, or to use homologous ones, to circumvent this problem.

Using the first strategy, the group of Ernst developed the first gene reporter system described in *C. albicans*, which made use of the β -galactosidase activity coded by *Kluyveromyces lactis* *LAC4* gene.¹⁵⁴ β -Galactosidase activity was detected on solid plates or cell extracts supplemented with the chromogenic substrate X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase). The heterogeneity in expression observed in *C. albicans* transformants was interpreted in terms of the final plasmid destination within the cell, either integrated in low copy number in the genome or maintained as high copy number episomal multimerized DNA. Interestingly, *LAC4* gene mRNA presents two CUG codons,²¹⁹ thus indicating that these putative changes still allow enzymatic activity. This system has been adapted recently to allow the construction of in-frame protein fusions.⁶⁶ The availability of polyclonal antisera against Lac4p and the development of a light assay (1000-fold more sensitive than the standard colorimetric test)⁶⁶ will improve the usefulness of this system.

The luciferase from *Renilla reniformis* (a luciferase gene lacking CUG codons) has also been successfully used to monitor *C. albicans* gene expression.²⁷⁶ Four different promoters *GAL1*, *EFI- α 2*, *WHI1* and *OP4* were studied using this system and shown to be either constitutive (*EFI- α 2*), regulated by galactose (*GAL1*) or phase-specific (*WHI1* or *OP4*). A major advantage of this system is that it is completely devoid of background, thus enabling measurement of weak promoters. This bioluminescent system is about 60-fold less efficient in intact cells than in extracts. Green fluorescent protein (GFP),³⁶ a very useful monitor of gene expression, is not expressed in *C. albicans*. GFP-derivatives have recently been obtained which are optimized for flow cytometry analysis.⁵⁰ GFP has a unique CUG codon, but its mutation does not allow GFP detection.⁴⁹ However, it has been genetically optimized in its codon usage to yield a GFP-derivative efficiently expressed in *C. albicans*.⁴⁹ This system should find application not only in gene regulation studies but also in the determination of protein localization.

Two different systems have made use of homologous reporter genes. The *URA3* gene of *C. albicans* has been used recently.¹⁸⁹ This system is very sensitive, allowing detection of single-copy genes

as well as the construction of amino-terminal, in-frame, enzymatically active protein fusions. However, both the generation of cell extracts and suitable auxotrophic host strains are required to quantify gene expression precisely. Another system has made use of the major glucanase from *C. albicans*, *XOG1*.³⁷ This system is useful in *S. cerevisiae* and, in *C. albicans*, works on solid and/or liquid media, allowing the use of flow cytometry and therefore enabling a precise cell-by-cell estimation of gene regulation.⁸⁹ Specific strains deleted for the *XOG1* gene are, similarly to the previous system, necessary to diminish the background glucanase activity in cells, which could interfere when quantifying weakly expressed genes. The introduction of a glycosylphosphatidylinositol anchoring domain, to the C-terminal end of the protein, anchors the activity to the cell, improving the quantification of expression in flow cytometric analysis.⁹⁰ The functionality of *XOG1* as gene reporter in *S. cerevisiae*⁴⁵ permits comparative studies to be performed.

The improvement of these and other gene reporters will allow studies on the regulation of already-cloned *C. albicans* genes to be undertaken. It may also permit the identification of genes which are regulated in a variety of environmental conditions, thus improving our basic knowledge of the physiology and genetics of this organism.

CONCLUSIONS

There has been a large increase in our basic knowledge of *C. albicans*. Many genes involved in important physiological processes have now been isolated and the development of gene disruption techniques is enabling the analysis of their relevance to, and involvement in, a range of cellular processes. The utility of *S. cerevisiae* as a host organism to identify and characterize cloned *C. albicans* genes will still be essential. Not only is the complete sequence of the *S. cerevisiae* genome now available, but the ongoing global project to assess gene functionality in *S. cerevisiae* (EUROFAN) will provide a framework for *C. albicans* research. However, despite the similarities between both microorganisms, *C. albicans* is a pathogenic yeast, while *S. cerevisiae* is not. Therefore, a great effort should be made in future years, to explain this difference and generate the tools necessary for its analysis. As an example, the development of gene reporter assays will undoubtedly provide a useful tool for the identification of differentially expressed

genes and will allow approaches to be employed which are similar to those described in bacteria for the identification of pathogenicity determinants.^{165,166} Pure molecular genetic approaches will be then combined with more cell biological and biochemical approaches that will enable us to answer important questions about the biology and pathogenicity of this medically important yeast.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs Brown, Cannon, Ernst, Gow, Magee and Scherer for sharing results prior to publication. We also thank the enthusiastic contribution of R. M. Pérez-Díaz to the *C. albicans* research carried out in our department. *C. albicans* research in our laboratory is supported by FIS grant 95/0071-01, CYCIT grant SAF96-1540, Glaxo Wellcome S. A. and Pfizer S. A.

REFERENCES

- Aflalo, C. (1990). Targeting of cloned firefly luciferase to yeast mitochondria. *Biochemistry* **29**, 4758-4766.
- Alani, E., Cao, L. and Kleckner, N. (1987). A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics* **116**, 541-545.
- Alonso, R., Pla, J. and Nombela, C. Unpublished.
- Altboum, Z., Gottlieb, S., Lebens, G. A., Polacheck, I. and Segal, E. (1990). Isolation of the *Candida albicans* histidinol dehydrogenase (*HIS4*) gene and characterization of a histidine auxotroph. *J. Bacteriol.* **172**, 3898-3904.
- Anaissie, E. J. (1992). Opportunistic mycosis in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 43-53.
- Andaluz, E., Larriba, G. and Calderone, R. (1996). A *Candida albicans* gene encoding a DNA ligase. *Yeast* **12**, 893-898.
- Aoki, S. and Ito-Kuwa, S. (1987). Induction of petite mutation with acriflavine and elevated temperature in *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**, 269-277.
- Asakura, K., Iwaguchi, S.-I., Homma, M., Sukai, T., Higashide, K. and Tanaka, K. (1991). Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2531-2538.
- Bachmann, B. J. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Microbiol. Rev.* **54**, 130-197.
- Bard, M., Lees, N. D., Barbuch, R. J. and Sanglard, D. (1987). Characterization of a cytochrome P450 deficient mutant of *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 794-800.
- Barton, R. C. and Gull, K. (1992). Isolation, characterization, and genetic analysis of monosomic, aneuploid mutants of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **6**, 171-177.
- Barton, R. C. and Scherer, S. (1994). Induced chromosome rearrangements and morphologic variation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **176**, 756-763.
- Barton, R. C., van Belkum, A. and Scherer, S. (1995). Stability of karyotype in serial isolates of *Candida albicans* from neutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 794-796.
- Basrai, M. A., Lubkowitz, M. A., Perry, J. R., et al. (1995). Cloning of a *Candida albicans* peptide transport gene. *Microbiology* **141**, 1147-1156.
- Baymiller, J., Jennings, S., Kienzle, B., Gorman, J. A., Kelly, R. and McCullough, J. E. (1994). Isolation and sequence of the t-RNA ligase-encoding gene of *Candida albicans*. *Gene* **142**, 129-134.
- Becker, D. M. and Guarente, L. (1991). Transformation of yeast by electroporation. *Meth. Enzymol.* **194**, 182-187.
- Becker, J. M., Henry, L. K., Jiang, W. and Koltin, Y. (1995). Reduced virulence of *Candida albicans* mutants affected in multidrug resistance. *Infect. Immun.* **63**, 4515-4518.
- Ben-Yaacov, R., Knoller, S., Caldwell, G. A., Becker, J. M. and Koltin, Y. (1994). *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**, 648-652.
- Bertram, G., Swoboda, R. K., Gow, N. A. R., Gooday, G. W. and Brown, A. J. P. (1996). Structure and regulation of the *Candida albicans* *ADH1* gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. *Yeast* **12**, 115-128.
- Birse, C. E., Irwin, M. Y., Fonzi, W. A. and Sypherd, P. S. (1993). Cloning and characterization of *ECE1*, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **61**, 3648-3655.
- Boken, D. J., Swindells, S. and Rinaldi, M. G. (1993). Fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 1018-1021.
- Boone, C., Sdicu, A., Laroche, M. and Bussey, H. (1991). Isolation from *Candida albicans* of a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* *KRE1* gene, which is involved in cell wall beta-glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **173**, 6859-6864.
- Broughton, M. C., Bard, M. and Lees, N. D. (1991). Polyene resistance in ergosterol producing strains of *Candida albicans*. *Mycoses* **34**, 75-83.
- Brown, A. J., Bertram, G., Feldmann, P. J., Pegg, M. W. and Swoboda, R. K. (1991). Codon utilisation in the pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Nucl. Acids Res.* **19**, 4298.

25. Brown, D. H., Jr and Kumamoto, C. A. (1996). Isolation of *Candida albicans* mutants which exhibit an increased propensity to form hyphae. In *ASM Conference on Candida and Candidiasis: Biology, Pathogenesis, and Management*. American Society for Microbiology, San Diego, California.
26. Brown, D. H., Jr, Slobodkin, I. V. and Kumamoto, C. A. (1996). Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 75–80.
27. Bustamante, C., Gurrieri, S. and Smith, S. B. (1993). Towards a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis. *Trends Biotechnol.* **11**, 23–30.
28. Byron, J. K., Clemons, K. V., McCusker, J. H., Davis, R. W. and Stevens, D. A. (1995). Pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae* in complement factor five-deficient mice. *Infect. Immun.* **63**, 478–485.
29. Cannon, R. *HEX1* as gene reporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Unpublished.
30. Cannon, R. D. (1986). Isolation of a mycelial mutant of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2405–2407.
31. Cannon, R. D., Jenkinson, H. F. and Shepherd, M. G. (1990). Isolation and nucleotide sequence of an autonomously replicating sequence (ARS) element functional in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **221**, 210–218.
32. Cannon, R. D., Jenkinson, H. F. and Shepherd, M. G. (1992). Cloning and expression of *Candida albicans* *ADE2* and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **235**, 453–457.
33. Cannon, R. D., Niimi, K., Jenkinson, H. F. and Shepherd, M. G. (1994). Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* beta-N-acetylglucosaminidase (*HEX1*) gene. *J. Bacteriol.* **176**, 2640–2647.
34. Chaffin, W. L., Collins, B., Marx, J. N., Cole, G. T. and Morrow, K. J., Jr. (1993). Characterization of mutant strains of *Candida albicans* deficient in expression of a surface determinant. *Infect. Immun.* **61**, 3449–3458.
35. Chakraborty, B. N., Patterson, N. A. and Kapoor, M. (1991). An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Can. J. Microbiol.* **37**, 858–863.
36. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–805.
37. Chambers, R. S., Broughton, M. J., Cannon, R. D., Carne, A., Emerson, G. W. and Sullivan, P. A. (1993). An exo-beta-(1,3)-glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 325–334.
38. Chen Wu, J. L., Zwicker, J., Bowen, A. R. and Robbins, P. W. (1992). Expression of chitin synthase genes during yeast and hyphal growth phases of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **6**, 497–502.
39. Chen, J. Y. and Fonzi, W. A. (1992). A temperature-regulated, retrotransposon-like element from *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **174**, 5624–5632.
40. Chibana, H., Iwaguchi, S., Homma, M., Chindamporn, A., Nakagawa, Y. and Tanaka, K. (1994). Diversity of tandemly repetitive sequences due to short periodic repetitions in the chromosomes of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **176**, 3851–3858.
41. Chibana, H., Scherer, S. and Magee, P. T. (1996). STS map of chromosome 7 in *Candida albicans*. In *Abstracts from the ASM Conference on Candida and Candidiasis: Biology, Pathogenesis, and Management*. American Society for Microbiology, San Diego, California.
42. Chindamporn, A., Nakagawa, Y., Homma, M., Chibana, H., Doi, M. and Tanaka, K. (1995). Analysis of the chromosomal localization of the repetitive sequences (RPSs) in *Candida albicans*. *Microbiology* **141**, 469–476.
43. Chu, W. S., Magee, B. B. and Magee, P. T. (1993). Construction of an *SfiI* macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J. Bacteriol.* **175**, 6637–6651.
44. Chu, W. S., Rikkerink, E. H. and Magee, P. T. (1992). Genetics of the white-opaque transition in *Candida albicans*: demonstration of switching recessivity and mapping of switching genes. *J. Bacteriol.* **174**, 2951–2957.
45. Cid, V. J., Álvarez, A., Santos, A. I., Nombela, C. and Sánchez, M. (1994). Yeast exo-beta-glucanases can be used as efficient and readily detectable reporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 747–756.
46. Clark, K. L., Feldmann, P. J., Dignard, D., et al. (1995). Constitutive activation of the *Saccharomyces cerevisiae* mating response pathway by a MAP kinase kinase from *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 609–621.
47. Colthurst, D. R., Schauder, B. S., Hayes, M. V. and Tuite, M. F. (1992). Elongation factor 3 (EF-3) from *Candida albicans* shows both structural and functional similarity to EF-3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**, 1025–1033.
48. Cormack, B. P. Unpublished.
49. Cormack, B. P. and Brown, A. J. P. Unpublished.
50. Cormack, B. P., Valdivia, R. and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33–38.

51. Corner, B. E. and Poulter, R. T. (1989). Interspecific complementation analysis by protoplast fusion of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* adenine auxotrophs. *J. Bacteriol.* **171**, 3586–3589.
52. Costanzo, M. C. and Fox, T. D. (1988). Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics* **120**, 667–670.
53. Cutler, J. E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 187–218.
54. Damagnez, V. and Cottarel, G. (1996). *Candida albicans* *CDK1* and *CYB1*: cDNA homologues of the *cdc2/CDC28* and *cdc13/CLB1/CLB2* cell cycle control genes. *Gene* **172**, 137–141.
55. Damagnez, V., Rolfe, M. and Cottarel, G. (1995). *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans* cDNA homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *UBC4* gene. *Gene* **155**, 137–138.
56. Debono, M. and Gordee, R. S. (1994). Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 471–497.
57. Denich, K. T., Malloy, P. J. and Feldman, D. (1992). Cloning and characterization of the gene encoding the ADP-ribosylation factor in *Candida albicans*. *Gene* **110**, 123–128.
58. Di Domenico, B. J., Brown, N. H., Lupisella, J., Greene, J. R., Yanko, M. and Koltin, Y. (1994). Homologs of the yeast neck filament associated genes: isolation and sequence analysis of *Candida albicans* *CDC3* and *CDC10*. *Mol. Gen. Genet.* **242**, 689–698.
59. Di Domenico, B. J., Lupisella, J., Sandbaken, M. and Chakraborty, K. (1992). Isolation and sequence analysis of the gene encoding translation elongation factor 3 from *Candida albicans*. *Yeast* **8**, 337–352.
60. Diener, A. C. and Fink, G. R. (1996). *DLH1* is a functional *Candida albicans* homologue of the meiosis-specific gene *DMC1*. *Genetics* **143**, 769–776.
61. Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A. and Tanaka, K. (1992). Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2243–2251.
62. Dujon, B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet.* **12**, 263–270.
63. Dupont, B. (1992). Antifungal therapy in AIDS patients. In Bennett, J. E., Hay, R. J. and Peterson, P. K. (Eds), *New Strategies in Fungal Disease*. Churchill Livingstone Inc., London, pp. 290–300.
64. Elorza, M. V., Sentandreu, R. and Ruiz-Herrera, J. (1994). Isolation and characterization of yeast monomorphic mutants of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **176**, 2318–2325.
65. Ernst, J. Personal communication.
66. Ernst, J. Personal communication.
67. Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M. V. and Sentandreu, R. (1995). Cloning of a DNA fragment encoding part of a 70-kDa heat shock protein of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 95–100.
68. Ferrara, A., Cafferkey, R. and Livi, G. P. (1992). Cloning and sequence analysis of a rapamycin-binding protein-encoding gene (*RBPI*) from *Candida albicans*. *Gene* **113**, 125–127.
69. Fling, M. E., Kopf, J., Tamarkin, A., Gorman, J. A., Smith, H. A. and Koltin, Y. (1991). Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol. Gen. Genet.* **227**, 318–329.
70. Fonzi, W. A. and Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717–728.
71. Fox, J. L. (1993). Fungal infection rates are increasing. *ASM News* **10**, 515–518.
72. Franceschi, M., Denaro, M., Irdani, T., et al. (1991). A dihydrofolate reductase gene from *Candida albicans*: molecular cloning. *FEMS Microbiol. Lett.* **64**, 179–182.
73. Franklyn, K. M. and Warmington, J. R. (1993). Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Candida albicans* enolase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**, 101–107.
74. Fried, H. M. and Warner, J. R. (1981). Cloning of yeast gene for trichodermin resistance and ribosomal protein L3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 238–242.
75. Gale, C., Finkel, D., Tao, N., et al. (1996). Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 357–361.
76. Ganesan, K., Banerjee, A. and Datta, A. (1991). Molecular cloning of the secretory acid proteinase gene from *Candida albicans* and its use as a species-specific probe. *Infect. Immun.* **59**, 2972–2977.
77. Geber, A., Williamson, P. R., Rex, J. H., Sweeney, E. C. and Bennett, J. E. (1992). Cloning and characterization of a *Candida albicans* maltase gene involved in sucrose utilization. *J. Bacteriol.* **174**, 6992–6996.
78. Georgopapadakou, N. H. and Tkacz, J. S. (1995). The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol.* **3**, 98–104.
79. Georgopapadakou, N. H. and Walsh, T. J. (1994). Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* **264**, 371–373.
80. Georgopapadakou, N. H. and Walsh, T. J. (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunological strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 279–291.
81. Ghannoum, M. A., Spellberg, B., Saporito-Irwin, S. M. and Fonzi, W. A. (1995). Reduced virulence of *Candida albicans* *PHR1* mutants. *Infect. Immun.* **63**, 4528–4530.

82. Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl. Acids Res.* **20**, 1425.
83. Gil, C., Pomés, R. and Nombela, C. (1988). A complementation analysis by parasexual recombination of *Candida albicans* morphological mutants. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1587–1595.
84. Gil, C., Pomés, R. and Nombela, C. (1990). Isolation and characterization of *Candida albicans* morphological mutants derepressed for the formation of filamentous hypha-type structures. *J. Bacteriol.* **172**, 2384–2391.
85. Gillum, A. M., Tsay, E. Y. H. and Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.* **198**, 179–182.
86. Gimeno, C. J., Ljungdhal, P. O., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077–1090.
87. Goldberg, D., Marbach, I., Gross, E., Levitzki, A. and Simchen, G. (1993). A *Candida albicans* homolog of *CDC25* is functional in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **213**, 195–204.
88. Goldway, M., Teff, D., Schmidt, R., Oppenheim, A. B. and Koltin, Y. (1995). Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the *BEN^R* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 422–426.
89. González Garcés, M. M., Hernáez, M. L., Molero, G., et al. (1996). Development of *C. albicans* genetic tools: use of *XOG1* as gene reporter. In *Abstracts from the ASM Conference on Candida and Candidiasis: Biology, Pathogenesis, and Management*. American Society for Microbiology, San Diego, California.
90. González Garcés, M. M., Pla, J., Sánchez, M. and Nombela, C. Unpublished.
91. Gorman, J. A., Chan, W. and Gorman, J. W. (1991). Repeated use of *GALI* for gene disruption in *Candida albicans*. *Genetics* **129**, 19–24.
92. Gorman, J. A., Gorman, J. W. and Koltin, Y. (1992). Direct selection of galactokinase-negative mutants of *Candida albicans* using 2-deoxygalactose. *Curr. Genet.* **21**, 203–206.
93. Goshorn, A. K., Grindle, S. M. and Scherer, S. (1992). Gene isolation by complementation in *Candida albicans* and applications to physical and genetic mapping. *Infect. Immun.* **60**, 876–884.
94. Goshorn, A. K. and Scherer, S. (1989). Genetic analysis of prototrophic natural variants of *Candida albicans*. *Genetics* **123**, 667–673.
95. Gow, N. A., Robbins, P. W., Lester, J. W., et al. (1994). A hyphal-specific chitin synthase gene (*CHS2*) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **13**, 6216–6220.
96. Gow, N. A. R., Swoboda, R., Bertram, G., Gooday, G. W. and Brown, A. J. P. (1993). Key genes in the regulation of dimorphism of *Candida albicans*. In van den Bossche, H., Odds, F. and Kerridge, D. (Eds), *Dimorphic Fungi in Biology and Medicine*. Plenum Press, New York, pp. 61–72.
97. Hatab, M. A. and Whittaker, P. A. (1992). Isolation and characterization of respiration-deficient mutants from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **61**, 207–219.
98. Haught, M. A. and Sarachek, A. (1985). Transmission and expression of mutations to nalidixic acid resistance among products of protoplast fusion crosses of *Candida albicans*. *Mutat. Res.* **152**, 15–23.
99. Hector, R. F. (1993). Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 1–21.
100. Heinemann, J. A. and Sprague, G. F., Jr. (1989). Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* **340**, 205–209.
101. Heinemann, J. A. and Sprague, G. F., Jr. (1991). Transmission of plasmid DNA to yeast by conjugation with bacteria. *Meth. Enzymol.* **194**, 187–195.
102. Henson, O. E. and McClary, D. O. (1979). Growth inhibition of *Candida albicans* by folate pathway inhibitors. Their potential in the selection of auxotrophs. *Antonie Van Leeuwenhoek* **45**, 211–223.
103. Hernáez, M., Pla, J. and Nombela, C. Unpublished.
104. Herreros, E., García-Sáez, M. I., Nombela, C. and Sánchez, M. (1992). A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation. *Mol. Microbiol.* **6**, 3567–3574.
105. Hieter, P., Mann, C., Snyder, M. and Davis, R. W. (1985). Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* **40**, 381–392.
106. Higgins, D. R. and Strathern, J. N. (1991). Electroporation-stimulated recombination in yeast. *Yeast* **7**, 823–831.
107. Hilton, C., Markie, D., Corner, B., Rikkerink, E. and Poulter, R. (1985). Heat shock induces chromosome loss in the yeast *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.* **200**, 162–168.
108. Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R. (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929–1933.
109. Hitchcock, C. A., Pye, G. W., Troke, P. F., Johnson, E. M. and Warnock, D. W. (1993). Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1962–1965.

110. Hitchcock, C. A., Russell, N. J. and Barrett-Bee, K. J. (1987). Sterols in *Candida albicans* mutants resistant to polyene or azole antifungals, and of a double mutant *C. albicans* 6.4. *Crit. Rev. Microbiol.* **15**, 111–115.
111. Hoberg, K. A., Cihlar, R. L. and Calderone, R. A. (1986). Characterization of cerulenin-resistant mutants of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **51**, 102–109.
112. Howard, D. H., Zeuthen, M. L. and Dabrowa, N. (1986). Phenotypic characteristics of a slow-growing, nongerminating variant of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2359–2366.
113. Hoyer, L. L., Cieslinski, L. B., McLaughlin, M. M., Torphy, T. J., Shatzman, A. R. and Livi, G. P. (1994). A *Candida albicans* cyclic nucleotide phosphodiesterase: cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology* **140**, 1533–1542.
114. Hoyer, L. L., Magee, B. B., Rikkerink, E. H. and Scherer, S. (1994). The *ARG4* gene of *Candida albicans*. *Gene* **2**, 213–218.
115. Hsiao, C. L. and Carbon, J. (1979). High-frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned yeast *ARG4* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3829–3833.
116. Hubbard, M. J., Markie, D. and Poulter, R. (1986). Isolation and morphological characterization of a mycelial mutant of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **165**, 61–65.
117. Hube, B., Turver, C. J., Odds, F. C., et al. (1991). Identification, cloning and characterization of the gene for the secretory aspartate protease of *Candida albicans*. *Mycoses* **34**, 59–61.
118. Hudson, T. J., Stein, L. D., Gerety, S. S., et al. (1995). An STS-based map of the human genome. *Science* **270**, 1945–1954.
119. Ireland, R. and Sarachek, A. (1967). A unique minute-rough colonial variant of *C. albicans*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **35**, 346–360.
120. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163–168.
121. Iwaguchi, S., Homma, M. and Tanaka, K. (1992). Clonal variation of chromosome size derived from the rDNA cluster region in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1177–1184.
122. Iwaguchi, S.-I., Homma, M., Chibana, H. and Tanaka, K. (1992). Isolation and characterization of a repeated sequence (RPS1) of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1893–1900.
123. Iwaguchi, S.-I., Homma, M. and Tanaka, K. (1990). Variation in the electrophoretic karyotype analysed by the assignment of DNA probes in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2433–2442.
124. Jenkinson, H. F., Schep, G. P. and Shepherd, M. G. (1988). Cloning and expression of the 3-isopropylmalate dehydrogenase gene from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**, 285–289.
125. Jenkinson, H. F. and Shepherd, M. G. (1987). A mutant of *Candida albicans* deficient in beta-N-acetylglucosaminidase (chitinase). *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2097–2106.
126. Johnston, L. H. and Barker, D. G. (1987). Characterisation of an autonomously replicating sequence from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* **207**, 161–164.
127. Kakar, S. N. and Magee, P. T. (1982). Genetic analysis of *Candida albicans*: identification of different isoleucine-valine, methionine, and arginine alleles by complementation. *J. Bacteriol.* **151**, 1247–1252.
128. Kakar, S. N., Partridge, R. M. and Magee, P. T. (1983). A genetic analysis of *Candida albicans*: isolation of a wide variety of auxotrophs and demonstration of linkage and complementation. *Genetics* **104**, 241–255.
129. Karube, I., Eiichi, T. and Matsuoka, H. (1985). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse. *FEBS Lett.* **182**, 90–94.
130. Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J. and Iwasaki, S. (1989). The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature* **341**, 164–166.
131. Kelly, R. and Kwon Chung, K. J. (1992). A zinc finger protein from *Candida albicans* is involved in sucrose utilization. *J. Bacteriol.* **174**, 222–232.
132. Kelly, R., Miller, S. M. and Kurtz, M. B. (1988). One-step gene disruption by cotransformation to isolate double auxotrophs in *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.* **214**, 24–31.
133. Kelly, R., Miller, S. M., Kurtz, M. B. and Kirsch, D. R. (1987). Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one-step gene disruption to isolate *ura3* mutants. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 199–208.
134. Kelly, R., Miller, S. M., Lai, M. H. and Kirsch, D. R. (1990). Cloning and characterization of the 2,3-oxidosqualene cyclase-coding gene of *Candida albicans*. *Gene* **87**, 177–183.
135. Kirsch, D. R., Lai, M. H. and O'Sullivan, J. (1988). Isolation of the gene for cytochrome P450L1A1 (lanosterol 14 alpha-demethylase) from *Candida albicans*. *Gene* **68**, 229–237.
136. Klig, L. S., Antonsson, B., Schmid, E. and Friedli, L. (1991). Inositol biosynthesis: *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* genes share common regulation. *Yeast* **7**, 325–336.
137. Koh, T. Y., Marriott, M. S., Taylor, J. and Gale, E. F. (1977). Growth characteristics and polyene sensitivity of a fatty acid auxotroph of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **102**, 105–110.

138. Koser, P. L., Livi, G. P., Levy, M. A., Rosenberg, M. and Bergsma, D. J. (1990). A *Candida albicans* homolog of a human cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Gene* **96**, 189–195.
139. Kouprina, N. Y. and Larinov, V. L. (1983). Study of a rDNA replicator in *Saccharomyces*. *Curr. Genet.* **7**, 433–438.
140. Kohler, G., White, T. C. and Agabian, N. (1996). The inosine monophosphate dehydrogenase gene of *Candida albicans* and its use as a drug selection marker. In *Abstracts from the ASM Conference on Candida and Candidiasis: Biology, Pathogenesis, and Management*. American Society for Microbiology, San Diego, California.
141. Kurtz, M. B., Abruzzo, G., Flattery, A., et al. (1996). Characterization of echinocandin-resistant mutants of *Candida albicans*: genetics, biochemical, and virulence studies. *Infect. Immun.* **64**, 3244–3251.
142. Kurtz, M. B., Cortelyou, M. W. and Kirsch, D. R. (1986). Integrative transformation of *Candida albicans* using a cloned *Candida ADE2* gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 142–149.
143. Kurtz, M. B., Cortelyou, M. W., Miller, S. M., Lai, M. and Kirsch, D. R. (1987). Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 209–217.
144. Kurtz, M. B., Kelly, R. and Kirsch, D. R. (1990). Molecular genetics of *Candida albicans*. In Kirsch, D. R., Kelly, R. and Kurtz, M. B. (Eds), *The Genetics of Candida*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 21–74.
145. Kurtz, M. B., Kirsch, D. R. and Kelly, R. (1988). The molecular genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Sci.* **5**, 58–63.
146. Kurtz, M. B. and Marrinan, J. (1989). Isolation of *hem3* mutants from *Candida albicans* by sequential gene disruption. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 47–52.
147. Kurtz, M. B. and Scherer, S. (1991). Molecular genetics of human fungal pathogens. In Bennet, J. W. and Lasure, L. L. (Eds), *More Gene Manipulations in Fungi*. Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 342–363.
148. Kwon-Chung, D. J., Wickes, B. L. and Merz, W. G. (1988). Association of electrophoretic karyotype of *Candida stellatoidea* with virulence in mice. *Infect. Immun.* **56**, 1814–1819.
149. Kwon-Chung, K. J., Lehman, D., Good, C. and Magee, P. T. (1985). Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **49**, 571–575.
150. La Valle, R., Bromuro, C., Ranucci, L., Muller, H. M., Crisanti, A. and Cassone, A. (1995). Molecular cloning and expression of a 70-kilodalton heat shock protein of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **63**, 4039–4045.
151. Lasker, B. A., Carle, G. F., Kobayashi, G. S. and Medoff, G. (1989). Comparison of the separation of *Candida albicans* chromosome-sized DNA by pulsed-field gel electrophoresis techniques. *Nucl. Acids Res.* **17**, 3783–3793.
152. Leberer, E., Marcus, D., Broadbent, I. D., et al. (1996). Homologs of the Ste20 and Ste7 protein kinases are involved in hyphal formation in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
153. Leuker, C. E. and Ernst, J. F. (1994). Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (anticodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: in vivo evidence for non-standard decoding of CUG codons. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 212–217.
154. Leuker, C. E., Hahn, A. M. and Ernst, J. F. (1992). β -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mol. Gen. Genet.* **235**, 235–241.
155. Liu, H., Kohler, J. and Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**, 1723–1726.
156. Liu, H., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**, 1741–1744.
157. Losberger, C. and Ernst, J. F. (1989). Sequence of the *Candida albicans* gene encoding actin. *Nucl. Acids Res.* **17**, 9488.
158. Losberger, C. and Ernst, J. F. (1989). Sequence and transcript analysis of the *C. albicans URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase. *Curr. Genet.* **16**, 153–158.
159. Lubkowitz, M., Hauser, L., Naider, F. and Becker, J. (1996). Cloning of a second peptide transport gene from *Candida albicans*. In *Abstracts from the ASM Conference on Candida and Candidiasis: Biology, Pathogenesis, and Management*. American Society for Microbiology, San Diego, California.
160. Madani, N. D., Malloy, P. J., Rodriguez Pombo, P., Krishnan, A. V. and Feldman, D. (1994). *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 922–926.
161. Magee, B. B., Koltin, Y., Gorman, J. A. and Magee, P. T. (1988). Assignment of cloned genes to the seven electrophoretically separated *Candida albicans* chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4721–4726.
162. Magee, P. T. (1993). Variations in chromosome size and organization in *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*. *Trends Microbiol.* **1**, 338–342.
163. Magee, P. T., Bowdin, L. and Staudinger, J. (1992). Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2674–2679.

164. Magee, P. T., Rikkerink, E. H. A. and Magee, B. B. (1988). Methods for the genetics and molecular biology of *Candida albicans*. *Anal. Biochem.* **175**, 361–372.
165. Mahan, M. J., Slauch, J. M., Hanna, P. C., *et al.* (1993). Selection for bacterial genes that are specifically induced in host tissues: the hunt for virulence factors. *Infect. Agents Dis.* **2**, 263–268.
166. Mahan, M. J., Slauch, J. M. and Mekalanos, J. J. (1993). Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**, 686–688.
167. Mahanty, S. K., Khaware, R., Ansari, S., Gupta, P. and Prasad, R. (1991). Vanadate-resistant mutants of *Candida albicans* show alterations in phosphate uptake. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**, 163–166.
168. Mahrous, M., Lott, T. J., Meyer, S. A., Sawant, A. D. and Ahearn, D. G. (1990). Electrophoretic karyotyping of typical and atypical *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 876–881.
169. Malathi, K., Ganesan, K. and Datta, A. (1994). Identification of a putative transcription factor in *Candida albicans* that can complement the mating defect of *Saccharomyces cerevisiae* *ste12* mutants. *J. Biol. Chem.* **269**, 22945–22951.
170. Malloy, P. J., Zhao, X., Madani, N. D. and Feldman, D. (1993). Cloning and expression of the gene from *Candida albicans* that encodes a high-affinity corticosteroid-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1902–1906.
171. Mason, A. B., Buckley, H. R. and Gorman, J. A. (1993). Molecular cloning and characterization of the *Candida albicans* enolase gene. *J. Bacteriol.* **175**, 2632–2639.
172. Maundrell, K., Wright, A. P., Piper, M. and Shall, S. (1985). Evaluation of heterologous ARS activity in *S. cerevisiae* using cloned DNA from *S. pombe*. *Nucl. Acids Res.* **13**, 3711–3722.
173. McCreath, K. J., Specht, C. A. and Robbins, P. W. (1995). Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2544–2548.
174. McCusker, J. H., Clemons, K. V., Stevens, D. A. and Davis, R. W. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42°C and form pseudohyphae. *Infect. Immun.* **62**, 5447–5455.
175. McEachern, M. J. and Hicks, J. B. (1993). Unusually large telomeric repeats in the yeast *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 551–560.
176. McElhaney-Feser, G. and Cihlar, R. L. (1995). Basis of cerulenin resistance of two strains of *Candida albicans*. *Microbiology* **141**, 1553–1558.
177. McIntosh, J. R. and West, R. R. (1995). A cell biological perspective on genome research. *J. Cell Biol.* **131**, 1361–1364.
178. Merz, W. G., Connelly, C. and Hieter, P. (1988). Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 842–845.
179. Mio, T., Yabe, T., Sudoh, M., *et al.* (1996). Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **178**, 2416–2419.
180. Miyasaki, S. H., White, T. C. and Agabian, N. (1994). A fourth secreted aspartyl proteinase gene (*SAP4*) and a *CARE2* repetitive element are located upstream of the *SAP1* gene in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **176**, 1702–1710.
181. Monk, B. C., Kurtz, M. B., Marrinan, J. A. and Perlin, D. S. (1991). Cloning and characterization of the plasma membrane H(+)-ATPase from *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **173**, 6826–6836.
182. Monod, M., Togni, G., Hube, B. and Sanglard, D. (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol.* **13**, 357–368.
183. Monteoliva, L., Sánchez, M., Pla, J., Gil, C. and Nombela, C. (1996). Cloning of *SEC14* gene of *Candida albicans*. *Yeast* **12**, 1097–1105.
184. Morrow, B., Srikantha, T., Anderson, J. and Soll, D. R. (1993). Coordinate regulation of two opaque-phase-specific genes during white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **61**, 1823–1828.
185. Morrow, B., Srikantha, T. and Soll, D. R. (1992). Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2997–3005.
186. Mortimer, R. K., Contopoulou, C. R. and King, J. S. (1992). Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*, Edition 11. *Yeast* **8**, 817–902.
187. Mukhtar, M., Logan, D. A. and Kaufer, N. F. (1992). The carboxypeptidase Y-encoding gene from *Candida albicans* and its transcription during yeast-to-hyphae conversion. *Gene* **121**, 173–177.
188. Myers, K. K., Fonzi, W. A. and Sypherd, P. S. (1992). Isolation and sequence analysis of the gene for translation elongation factor 3 from *Candida albicans*. *Nucl. Acids Res.* **20**, 1705–1710.
189. Myers, K. K., Sypherd, P. S. and Fonzi, W. A. (1995). Use of *URA3* as a reporter of gene expression in *C. albicans*. *Curr. Genet.* **27**, 243–248.
190. Natarajan, K. and Datta, A. (1993). Molecular cloning and analysis of the *NAG1* cDNA coding for glucosamine-6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 9206–9214.
191. Navarro-García, F., Pérez-Díaz, R., Magee, B. B., Pla, J., Nombela, C. and Magee, P. T. (1995). Chromosome reorganization in *Candida albicans* 1001 strain. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**, 361–366.
192. Navarro-García, F., Pérez-Díaz, R. M., Pla, J. and Nombela, C. Unpublished.
193. Navarro-García, F., Sánchez, M., Pla, J. and Nombela, C. (1995). Functional characterization of

- the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2197–2206.
194. Negredo, A. I., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J. and Nombela, C. (1997). Cloning, analysis, and one-step gene disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*. *Microbiology*, in press.
 195. Negredo, A. I., Pérez-Díaz, R. M., Gil, C., Pla, J. and Nombela, C. Unpublished.
 196. Newlon, C. S. (1988). Yeast chromosome replication and segregation. *Microbiol. Rev.* **52**, 568–601.
 197. Nieto, A., Sanz, P., Sentandreu, R. and del Castillo Agudo, L. (1993). Cloning and characterization of the *SEC18* gene from *Candida albicans*. *Yeast* **9**, 875–887.
 198. Nombela, C., Pla, J., Herreros, E., Gil, C., Molina, M. and Sánchez, M. (1992). Novel targets for antifungal drugs. In Bennett, J. E., Hay, R. J. and Peterson, P. K. (Eds), *New Strategies in Fungal Disease*. Churchill Livingstone, London, pp. 117–129.
 199. Nombela, C., Pomés, R. and Gil, C. (1987). Protoplasts fusion hybrids from *Candida albicans* morphological mutants. *Crit. Rev. Microbiol.* **15**, 79–85.
 200. Odds, F. C. (Ed.) (1988). *Candida and Candidosis*. Baillière Tindall, London.
 201. Odds, F. C. (1993). Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**, 463–471.
 202. Odds, F. C. (1994). *Candida* species and virulence. *ASM News* **60**, 313–318.
 203. Olaiya, A. F. and Sogin, S. J. (1979). Ploidy determination of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **140**, 1043–1049.
 204. Ostrander, D. B. and Gorman, J. A. (1994). Characterization of the *Candida albicans* *TRP1* gene and construction of a homozygous *trp1* mutant by sequential co-transformation. *Gene* **148**, 179–185.
 205. Paravicini, G., Mendoza, A., Antonsson, B., Cooper, M., Losberger, C. and Payton, M. (1996). The *Candida albicans* *PKC1* gene encodes a protein kinase C homolog necessary for cellular integrity but not dimorphism. *Yeast* **12**, 741–756.
 206. Payne, J. W. and Shallow, D. A. (1985). Studies on drug targetting in the pathogenic fungus *C. albicans*: peptide transport mutants resistant to polyoxins, nikkomycins and bacitracin. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**, 55–60.
 207. Payne, T. L. and Calderone, R. A. (1995). Isolation of phosphoribosylpyrophosphate synthetase (*PRS1*) gene from *Candida albicans*. *Yeast* **11**, 1295–1302.
 208. Payton, M. A. and de Tiani, M. (1990). The isolation of osmotic-remedial conditional lethal mutants of *Candida albicans*. *Curr. Genet.* **17**, 293–296.
 209. Pereira, S. A. and Livi, G. P. (1993). Cloning and expression of the *ARO3* gene encoding DAHP synthase from *Candida albicans*. *Gene* **132**, 159–165.
 210. Pereira, S. A. and Livi, G. P. (1996). Aromatic amino-acid biosynthesis in *Candida albicans*: identification of the *ARO4* gene encoding a second DAHP synthase. *Curr. Genet.* **29**, 441–445.
 211. Pesti, M. and Ferenczy, L. (1982). Protoplast fusion hybrids of *Candida albicans* sterol mutants differing in nystatin resistance. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 123–128.
 212. Pesti, M., Horvath, L., Vigh, L. and Farkas, T. (1985). Lipid content and ESR determination of plasma membrane order parameter in *Candida albicans* sterol mutants. *Acta Microbiol. Hung.* **32**, 305–313.
 213. Pfaller, M. A., Rhine-Chalberg, J., Redding, S. W., et al. (1994). Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 59–64.
 214. Pfaller, M. A. and Wenzel, R. P. (1992). The impact of changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**, 287–291.
 215. Pierce, A. M., Pierce, H. D., Jr, Unrau, A. M. and Oehlschlager, A. C. (1978). Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants. *Can. J. Biochem.* **56**, 135–142.
 216. Pla, J., Pérez-Díaz, R. M., Navarro-García, F., Sánchez, M. and Nombela, C. (1995). Cloning of *Candida albicans* *HIS1* gene by direct homologous complementation of a histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector. *Gene* **165**, 115–120.
 217. Pla, J., Pérez-Díaz, R. M. and Nombela, C. Unpublished.
 218. Plovins, A., Álvarez, A., Ibáñez, M., Molina, M. and Nombela, C. (1994). Use of fluorescein-di-beta-D-galactopyranoside (FDG) and C12-FDG as substrates for beta-galactosidase detection by flow cytometry in animal, bacterial, and yeast cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4638–4641.
 219. Poch, O., L'Hôte, H., Dallery, V., Debeaux, F., Fleer, R. and Sodoyer, R. (1992). Sequence of the *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene* **118**, 55–63.
 220. Pomés, R., Gil, C. and Nombela, C. (1985). Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 2107–2113.
 221. Postlethwait, P. and Sundstrom, P. (1995). Genetic organization and mRNA expression of enolase genes of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **177**, 1772–1779.

222. Poulter, R. (1990). Classical methods for the genetic analysis of *Candida albicans*. In Kirsch, D. R., Kelly, R. and Kurtz, M. B. (Eds), *The Genetics of Candida*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 75–124.
223. Poulter, R. and Hanrahan, V. (1983). Conservation of genetic linkage in nonisogenic isolates of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **156**, 498–506.
224. Poulter, R., Hanrahan, V., Jeffery, K., Markie, D., Shepherd, M. G. and Sullivan, P. A. (1982). Recombination analysis of naturally diploid *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **152**, 969–975.
225. Poulter, R., Jeffery, K., Hubbard, M. J., Shepherd, M. G. and Sullivan, P. A. (1981). Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *J. Bacteriol.* **146**, 833–840.
226. Poulter, R. T. and Rikkerink, E. H. (1983). Genetic analysis of red, adenine-requiring mutants of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **156**, 1066–1077.
227. Poulter, R. T. M. (1991). Parasexual genetics of *Candida albicans*. In Prasad, R. (Ed.), *Candida albicans Cellular and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 164–187.
228. Prasad, R. (Ed.) (1991). *Candida albicans Cellular and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin.
229. Prasad, R., De Wergifosse, P., Goffeau, A. and Balzi, E. (1995). Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDRI*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* **27**, 320–329.
230. Ramsey, H., Morrow, B. and Soll, D. R. (1994). An increase in switching frequency correlates with an increase in recombination of the ribosomal chromosomes of *Candida albicans* strain 3153A. *Microbiology* **7**, 1525–1531.
231. Richardson, M. D. (1991). Opportunistic and pathogenic fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**, 1–11.
232. Riggsby, W. S., Torres-Bauza, L. J., Wills, J. W. and Townes, T. M. (1982). DNA content, kinetic complexity, and the ploidy question in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 853–862.
233. Rodland, K. D. and Russell, P. J. (1982). Regulation of ribosomal RNA cistron number in a strain of *Neurospora crassa* with a duplication of the nucleolus organizer region. *Biochim. Biophys. Acta* **697**, 162–169.
234. Rose, M. and Botstein, D. (1983). Construction and use of gene fusions to *lacZ* (beta-galactosidase) that are expressed in yeast. *Meth. Enzymol.* **101**, 167–180.
235. Rosenbluh, A., Mevarech, M., Koltin, Y. and Gorman, J. A. (1985). Isolation of genes from *Candida albicans* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **200**, 500–502.
236. Russell, P. J. and Rodland, K. D. (1986). Magnification of rRNA gene number in a *Neurospora crassa* strain with a partial deletion of the nucleolus organizer. *Chromosoma* **93**, 337–340.
237. Rustchenko, E. P., Curran, T. M. and Sherman, F. (1993). Variations in the number of ribosomal DNA units in morphological mutants and normal strains of *Candida albicans* and in normal strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **175**, 7189–7199.
238. Rustchenko, E. P., Howard, D. H. and Sherman, F. (1994). Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. *J. Bacteriol.* **176**, 3231–3241.
239. Rustchenko-Bulgac, E. P. (1991). Variations of *Candida albicans* electrophoretic karyotypes. *J. Bacteriol.* **173**, 6586–6596.
240. Rustchenko-Bulgac, E. P. and Howard, D. H. (1993). Multiple chromosomal and phenotypic changes in spontaneous mutants of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1195–1207.
241. Rustchenko-Bulgac, E. P., Sherman, F. and Hicks, J. B. (1990). Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **172**, 1276–1283.
242. Ryley, J. F. and Ryley, N. G. (1990). *Candida albicans*—do mycelia matter? *J. Med. Vet. Mycol.* **28**, 225–239.
243. Ryley, J. F., Wilson, R. G. and Barrett-Bee, K. J. (1984). Azole resistance in *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **22**, 53–63.
244. Sadhu, C., Hoekstra, D., McEachern, M. J., Reed, S. I. and Hicks, J. B. (1992). A G-protein alpha subunit from asexual *Candida albicans* functions in the mating signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by the *al-alpha* 2 repressor. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1977–1985.
245. Sadhu, C., McEachern, M. J., Rustchenko-Bulgac, E. P., Schmid, J., Soll, D. R. and Hicks, J. B. (1991). Telomeric and dispersed repeat sequences in *Candida* yeasts and their use in strain identification. *J. Bacteriol.* **173**, 842–850.
246. San José, C., Alonso, R., Pérez-Díaz, R., Pla, J. and Nombela, C. (1996). The MAP kinase homolog *HOG1* gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **178**, 5850–5852.
247. Sanglard, D. and Fiechter, A. (1992). DNA transformations of *Candida tropicalis* with replicating and integrative vectors. *Yeast* **8**, 1065–1075.
248. Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J. L., Monod, M. and Bille, J. (1995). Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2378–2386.
249. Santos, M. A., Keith, G. and Tuite, M. F. (1993). Non-standard translational events in *Candida*

- albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *EMBO J.* **12**, 607-616.
250. Santos, M. A. and Tuite, M. F. (1995). The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1481-1486.
 251. Saporito Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. and Fonzi, W. A. (1995). *PHRI*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 601-613.
 252. Saporito, S. M. and Sypherd, P. S. (1991). The isolation and characterization of a calmodulin-encoding gene (*CMD1*) from the dimorphic fungus *Candida albicans*. *Gene* **106**, 43-49.
 253. Sarachek, A. and Bish, J. T. (1976). Effects of growth temperature and caffeine on genetic responses of *Candida albicans* to ethyl methanesulfonate, nitrous acid and ultraviolet radiation. *Mycopathologia* **60**, 51-56.
 254. Sarachek, A. and Lovchik, J. A. (1989). Unidirectional internuclear transfer of linked genes in heterokaryons of *Candida albicans*. *J. Basic Microbiol.* **29**, 527-535.
 255. Sarachek, A. and Rhoads, D. D. (1983). Effects of growth temperatures on plating efficiencies and stabilities of heterokaryons of *C. albicans*. *Mycopathologia* **83**, 87-91.
 256. Sarachek, A., Rhoads, D. D. and Schwarzhoff, R. H. (1981). Hybridization of *Candida albicans* through fusion of protoplasts. *Arch. Microbiol.* **129**, 1-8.
 257. Sarachek, A. and Weber, D. A. (1984). Temperature-dependent internuclear transfer of genetic material in heterokaryons of *Candida albicans*. *Curr. Genet.* **8**, 181-187.
 258. Scherer, S. and Magee, P. T. (1990). Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* **54**, 226-241.
 259. Scherer, S. and Stevens, D. A. (1988). A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1452-1456.
 260. Schiestl, R. H. and Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**, 339-346.
 261. Sentandreu, M., Elorza, M. V., Valentin, E., Sentandreu, R. and Gozalbo, D. (1995). Cloning of cDNAs coding for *Candida albicans* cell surface proteins. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**, 105-111.
 262. Shepherd, M. G., Poulter, R. T. and Sullivan, P. A. (1985). *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 579-614.
 263. Sherlock, G., Bahman, A. M., Mahal, A., Shieh, J. C., Ferreira, M. and Rosamond, J. (1994). Molecular cloning and analysis of *CDC28* and cyclin homologues from the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 716-723.
 264. Shimokawa, O., Kato, Y. and Nakayama, H. (1986). Accumulation of 14-methyl sterols and defective hyphal growth in *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **24**, 327-336.
 265. Shimokawa, O. and Nakayama, H. (1986). A *Candida albicans* rough-type mutant with increased cell surface hydrophobicity and a structural defect in the cell wall mannan. *J. Med. Vet. Mycol.* **24**, 165-168.
 266. Singer, S. C., Richards, C. A., Ferone, R., Benedict, D. and Ray, P. (1989). Cloning, purification, and properties of *Candida albicans* thymidylate synthase. *J. Bacteriol.* **171**, 1372-1378.
 267. Slutsky, B., Buffo, J. and Soll, D. R. (1985). High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* **230**, 666-669.
 268. Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. and Soll, D. R. (1987). 'White-opaque transition': a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **169**, 189-197.
 269. Smith, D. J., Cooper, M., Detiani, M., Losberger, C. and Payton, M. A. (1992). The *Candida albicans* *PMM1* gene encoding phosphomannomutase complements a *Saccharomyces cerevisiae* *sec 53-6* mutation. *Curr. Genet.* **22**, 501-503.
 270. Smith, D. J., Proudfoot, A. E., Detiani, M., Wells, T. N. and Payton, M. A. (1995). Cloning and heterologous expression of the *Candida albicans* gene *PMI1* encoding phosphomannose isomerase. *Yeast* **11**, 301-310.
 271. Smith, H. A., Allaudeen, H. S., Whitman, M. H., Koltin, Y. and Gorman, J. A. (1988). Isolation and characterization of a beta-tubulin gene from *Candida albicans*. *Gene* **63**, 53-63.
 272. Soll, D. R. (1992). High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 183-203.
 273. Soll, D. R., Morrow, B. and Srikantha, T. (1993). High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* **9**, 61-65.
 274. Southard, S. B. and Cihlar, R. L. (1995). Analysis and expression of the *Candida albicans* *FAS2* gene. *Gene* **156**, 133-138.
 275. Srikantha, T., Chandrasekhar, A. and Soll, D. R. (1995). Functional analysis of the promoter of the phase-specific *WH11* gene of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1797-1805.
 276. Srikantha, T., Klapach, A., Lorenz, W. W., et al. (1996). The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **178**, 121-129.
 277. Srikantha, T., Morrow, B., Schroppel, K. and Soll, D. R. (1995). The frequency of integrative transformation at phase-specific genes of *Candida albicans* correlates with their transcriptional state. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 342-352.

278. Srikantha, T. and Soll, D. R. (1993). A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *Gene* **131**, 53–60.
279. Staab, J. F., Ferrer, C. A. and Sundstrom, P. (1996). Developmental expression of a tandemly repeated, proline- and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **271**, 6298–6305.
280. Stark, M. J., Gregory, R. J., Gourse, R. L., et al. (1984). Effects of site-directed mutations in the central domain of 16 S ribosomal RNA upon ribosomal protein binding, RNA processing and 30 S subunit assembly. *J. Mol. Biol.* **178**, 303–322.
281. Stinchcomb, D. T., Struhl, K. and Davis, R. W. (1979). Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* **282**, 39–43.
282. Struhl, K., Stinchcomb, D. T., Scherer, S. and Davis, R. W. (1979). High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1035–1039.
283. Sudoh, M., Nagahashi, S., Doi, M., Ohta, A., Takagi, M. and Arisawa, M. (1993). Cloning of the chitin synthase 3 gene from *Candida albicans* and its expression during yeast-hyphal transition. *Mol. Gen. Genet.* **241**, 351–358.
284. Sudoh, M., Watanabe, M., Mio, T., et al. (1995). Isolation of canCHS1A, a variant gene of *Candida albicans* chitin synthase. *Microbiology* **141**, 2673–2679.
285. Sugiyama, H., Ohkuma, M., Masuda, Y., Park, S. M., Ohta, A. and Takagi, M. (1995). *In vivo* evidence for non-universal usage of the codon CUG in *Candida maltosa*. *Yeast* **11**, 43–52.
286. Sundstrom, P. and Aliaga, G. R. (1992). Molecular cloning of cDNA and analysis of protein secondary structure of *Candida albicans* enolase, an abundant, immunodominant glycolytic enzyme. *J. Bacteriol.* **174**, 6789–6799.
287. Sundstrom, P., Smith, D. and Sypherd, P. S. (1990). Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 alpha from the dimorphic yeast *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **172**, 2036–2045.
288. Suzuki, T., Kobayashi, I., Kanbe, T. and Tanaka, K. (1989). High frequency variation of colony morphology and chromosome reorganization in the pathogenic *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 425–434.
289. Swoboda, R. K., Bertram, G., Budge, S., Gooday, G. W., Gow, N. A. R. and Brown, A. J. P. (1995). Structure and regulation of the HSP90 gene from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **63**, 4506–4514.
290. Swoboda, R. K., Bertram, G., Hollander, H., et al. (1993). Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. *Infect. Immun.* **61**, 4263–4271.
291. Swoboda, R. K., Broadbent, I. D., Bertram, G., et al. (1995). Structure and regulation of a *Candida albicans* RP10 gene which encodes an immunogenic protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein 10. *J. Bacteriol.* **177**, 1239–1246.
292. Szostak, J. W. and Wu, R. (1980). Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **284**, 426–430.
293. Taylor, A., Giles, K., Sarthy, A. V., McGonigal, T. and Fostel, J. (1996). Identification of the gene encoding DNA topoisomerase I from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**, 113–121.
294. Thrash-Bingham, C. and Gorman, J. A. (1992). DNA translocations contribute to chromosome length polymorphisms in *Candida albicans*. *Curr. Genet.* **22**, 93–100.
295. Tuite, M. F. (1992). Antifungal drug development: the identification of new targets. *Trends Biotechnol.* **7**, 235–239.
296. Ueda, T., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Watanabe, K. (1994). Unique structure of new serine tRNAs responsible for decoding leucine codon CUG in various *Candida* species and their putative ancestral tRNA genes. *Biochimie* **76**, 1217–1222.
297. Vanden Bossche, H., Marichal, P. and Odds, F. C. (1994). Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.* **2**, 393–400.
298. Vieites, J. M., Navarro-García, F., Pérez-Díaz, R., Pla, J. and Nombela, C. (1994). Expression and *in vivo* determination of firefly luciferase as gene reporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1321–1327.
299. Walsh, T. J., van Gutsen, J., Polak, A. and Graybill, J. R. (1992). Pathogenesis, immunomodulation and antifungal therapy of experimental invasive candidiasis, histoplasmosis and aspergillosis: recent advances and concepts. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**, 225–240.
300. Weinberg, R. A., McWherter, C. A., Freeman, S. K., Wood, D. C., Gordon, J. I. and Lee, S. C. (1995). Genetic studies reveal that myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase is an essential enzyme in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **16**, 241–250.
301. Whelan, W. L. (1987). The genetic basis of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Crit. Rev. Microbiol.* **15**, 45–56.
302. Whelan, W. L., Beneke, E. S., Rogers, A. L. and Soll, D. R. (1981). Segregation of 5-fluorocytosine-resistance variants by *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**, 1078–1081.
303. Whelan, W. L., Delga, J. M., Wadsworth, E., et al. (1990). Isolation and characterization of cell surface mutants of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **58**, 1552–1557.

304. Whelan, W. L., Kirsch, D. R., Kwon-Chung, K. J., Wahl, S. M. and Smith, P. D. (1990). *Candida albicans* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: absence of a novel of hyper-virulent strain. *J. Infect. Dis.* **162**, 513–518.
305. Whelan, W. L. and Magee, P. T. (1981). Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **145**, 896–903.
306. Whelan, W. L., Markie, D. and Kwon-Chung, K. J. (1986). Complementation analysis of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 726–729.
307. Whelan, W. L., Partridge, R. M. and Magee, P. T. (1980). Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.* **180**, 107–113.
308. Whelan, W. L. and Soll, D. R. (1982). Mitotic recombination in *Candida albicans*: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **187**, 477–485.
309. White, T. C., Andrews, L. E., Maltby, D. and Agabian, N. (1995). The 'universal' leucine codon CTG in the secreted aspartyl proteinase 1 (*SAP1*) gene of *Candida albicans* encodes a serine *in vivo*. *J. Bacteriol.* **177**, 2953–2955.
310. White, T. C., Miyasaki, S. H. and Agabian, N. (1993). Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **175**, 6126–6133.
311. Whiteway, M., Dignard, D. and Thomas, D. Y. (1992). Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9410–9414.
312. Wickes, B., Staudinger, J., Magee, B. B., Kwon-Chung, K. J., Magee, P. T. and Scherer, S. (1991). Physical and genetic mapping of *Candida albicans*: several genes previously assigned to chromosome 1 map to chromosome R, the rDNA-containing linkage group. *Infect. Immun.* **59**, 2480–2484.
313. Wiegand, R. C., Carr, C., Minnerly, J. C., *et al.* (1992). The *Candida albicans* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase gene. Isolation and expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 8591–8598.
314. Wong, B., Murray, J. S., Castellanos, M. and Croen, K. D. (1993). D-arabitol metabolism in *Candida albicans*: studies of the biosynthetic pathway and the gene that encodes NAD-dependent D-arabitol dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **175**, 6314–6320.
315. Woolford, J. J. (1989). Nuclear pre-mRNA splicing in yeast. *Yeast* **5**, 439–457.
316. Wright, R. J., Carne, A., Hieber, A. D., Lamont, I. L., Emerson, G. W. and Sullivan, P. A. (1992). A second gene for a secreted aspartate proteinase in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **174**, 7848–7853.
317. Yadan, J. C., Gonneau, M., Sarthou, P. and Le Goffic, F. (1984). Sensitivity to nikkomycin Z in *Candida albicans*: role of peptide permeases. *J. Bacteriol.* **160**, 884–888.
318. Zhao, X. J. and Cihlar, R. L. (1994). Isolation and sequence of the *Candida albicans* *FAS1* gene. *Gene* **147**, 119–124.

Cloning, analysis and one-step disruption of the ARG5,6 gene of *Candida albicans*

A. Negrodo, L. Monteoliva, C. Gil, J. Pla and C. Nombela

Author for correspondence: J. Pla. Tel: +34 1 394 1617. Fax: +34 1 394 1745.
e-mail: jesuspla@eucmax.sim.ucm.es

Departamento de
Microbiología II, Facultad de
Farmacia, Universidad
Complutense de Madrid,
Avda. Ramón y Cajal s/n,
28040 Madrid, Spain

The ARG5,6 gene from the dimorphic fungus *Candida albicans* was cloned by functional complementation of the arginine auxotrophy present in strain EL2 (Arg⁻) using a gene library constructed in the double autonomously replicating sequence vector pRM1. Sequence analysis revealed a putative 857 amino acid polypeptide (95 kDa) which showed high homology (63% protein identity) to the *Saccharomyces cerevisiae* ARG5,6 gene. Similarly to the *S. cerevisiae* gene, the *C. albicans* ARG5,6 gene is responsible for both the acetylglutamate kinase and acetylglutamyl-phosphate reductase activities, the second and third steps of arginine biosynthesis at the mitochondria. The *C. albicans* ARG5,6 gene complemented the *arg6* mutation present in *S. cerevisiae* (strain D160-4D) on a yeast episomal plasmid using its own regulatory signals. A set of non-integrative high-efficiency plasmid vectors based on this gene marker was constructed and a null *C. albicans arg5,6Δ* strain was obtained using the common URA3-blaster strategy. In addition, we generated an *arg5,6Δ* null mutant in a single transformation event, thus improving the basic strategy for generating gene deletions in *C. albicans*.

Keywords: ARG5,6, *Candida albicans*, molecular biology, gene disruption, arginine

INTRODUCTION

Despite the importance of *Candida albicans* as a model pathogenic yeast, obtaining information about its genetics has been difficult due to its diploidy and lack of sexual cycle (Kurtz *et al.*, 1990; Scherer & Magee, 1990). Although *C. albicans* genetics have largely relied on *Saccharomyces cerevisiae* as an intermediate genetic host, some of the most interesting and peculiar processes in *C. albicans*, such as its ability to switch between a yeast and a mycelial form of growth and its pathogenicity to humans (Odds, 1988), cannot readily be studied vicariously through a knowledge of *S. cerevisiae*. The development of an efficient transformation system, with the construction of both autoreplicative plasmids and suitable host strains, is then one of the major goals to facilitate genetic analysis of the biology and pathogenicity of *C. albicans*.

Although Kurtz and colleagues described both the integrative transformation (Kurtz *et al.*, 1986) and the

development of autoreplicative plasmids (Kurtz *et al.*, 1987) in *Candida*, plasmids often multimerize in *C. albicans* leading to difficulties in their isolation (Goshorn *et al.*, 1992). We recently developed plasmids carrying two independent autonomously replicating sequences (Cannon *et al.*, 1990; Herreros *et al.*, 1992) that allow the introduction and recovery of DNA in *C. albicans* (Pla *et al.*, 1995). A second important tool in *C. albicans* molecular genetics is the availability of isogenic auxotrophic host strains. Although both UV-enhanced mitotic recombination (Kelly *et al.*, 1987; Sadhu *et al.*, 1992) and toxic metabolites (Gorman *et al.*, 1991) have been used for gene disruption in *C. albicans*, the most commonly employed system now used makes use of the strategy adapted by Fonzi & Irwin (1993), which requires two sequential steps of gene disruption using the *C. albicans* URA3 gene flanked by a heterologous *hisG* sequence from *Salmonella typhimurium*. This process could, however, be shortened if different genetic markers and appropriate strains were available for sequential disruptions. Although some nutritional genes have been isolated (Rosenbluh *et al.*, 1985; Goshorn *et al.*, 1992; Hoyer *et al.*, 1994; Pla *et al.*, 1995), there are no reports of strains with more than one auxotrophic marker obtained entirely by gene disruption.

The EMBL accession number for the nucleotide sequence reported in this paper is X98880.

In this work, we describe the isolation of the ARG5,6 gene from *C. albicans* by complementation of a mutagenized *C. albicans* arginine auxotrophic strain and its use in developing a genetic transformation system. In addition, we have constructed a triple *ura3Δ his1Δ arg5,6Δ* strain and demonstrate the generation of a homozygous *arg5,6Δ* null strain in a single transformation event.

METHODS

Strains and growth conditions. *C. albicans* and *Escherichia coli* strains are listed in Table 1. *C. albicans* strain 1001 (ATCC 64385), a wild-type strain from the Spanish Type Culture Collection, was used as the source of genomic DNA for the construction of a genomic library in plasmid pRM1 (Pla *et al.*, 1995). The following *S. cerevisiae* strains, obtained from the Yeast Genetic Stock Center (Berkeley, CA, USA), were used to check the function of the cloned *C. albicans* ARG5,6 gene by complementation: X3163-4C (MATa *arg1 met1 trp3 ade5 ura3 leu1 mal gal2*); STX63-8B (MATa *arg2 lys4 lys11 trp4 ade2 tyr1 rad2 gal2*); STX9-1A (MATa *arg3 ade2 gal2*); AB18-20A (MATa *arg4-8 ade2 ade5 CUP1⁺ leu2-3, 112 ura3-52 met13 cyh^r*); D160-4D (MATa *arg6 ura3 hom3 his1 trp2 ade1 met1 gal2*); X1049-9C (MATa *arg8 trp1 ura3 his3 asp5*); XJB17-2 (MATa *arg9 thr4 leu2 ade6 gal2*); and STX14-1C (MATa *arg10 ade2 gal2*). Yeast strains were grown in either YED medium (1%, w/v, yeast extract; 2%, w/v, glucose) or SD minimal medium (0.67% Yeast Nitrogen Base without amino acids; 2%, w/v, glucose), supplemented with uridine, histidine or arginine at 25 µg ml⁻¹, depending on the nutritional requirements, with continuous shaking at 30 °C. *C. albicans* Ura⁻ revertants were selected on 5-fluoroorotic acid plates as described previously by Navarro-García *et al.* (1995). *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) or Terrific Broth (TB) at 37 °C supplemented with 100 µg ampicillin ml⁻¹ for plasmid selection.

DNA manipulations. All DNA manipulations were carried out following standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989). Southern hybridization analysis was carried out using the Nonradioactive Labelling and Detection kit (Boehringer Mannheim) under high-stringency conditions on positively charged nylon membranes. For the determination of the ARG5,6 sequence, a 3.8 kb *Bam*HI–*Bam*HI insert from plasmid pAN1 was purified from agarose gels and sonicated to generate random fragments (300–600 bp in size) which were subcloned into the *Sma*I site of pUC19. Plasmid DNA was purified from *E. coli* transformants with Qiagen (Diagen) and both strands were sequenced with an Automated Sequencer (ALF; Pharmacia) according to Sanger *et al.* (1977) using the Universal and Reversal fluoresceinated primers. Sequence comparisons and homologies were carried out using the FASTA algorithm (Pearson & Lipman, 1988). DNA sequence analysis was performed with the PCGENE software.

Plasmid constructions and gene disruption. Plasmid pRM1, an efficient non-integrative plasmid, as well as its derived gene library have been described before (Pla *et al.*, 1995). The *E. coli*/yeast shuttle vector YEp352 has also been described previously by Hill *et al.* (1986). YEpARG was obtained by subcloning a 3.8 kb *Bam*HI–*Bam*HI fragment from pAN1 into the *Bam*HI site of YEp352. Plasmid pAN8, an autoreplicative plasmid which transforms *C. albicans* with high efficiency [$>5 \times 10^3$ transformants (µg DNA)⁻¹] and which is representative of a set of autoreplicative plasmids bearing this marker, was obtained by replacing the *Nae*I–*Sma*I fragment of pRM10 (Pla *et al.*, 1995) with a blunt-ended *Bam*HI–*Bam*HI fragment from pAN1. For the disruption of the *C. albicans* ARG5,6 gene, the same 4 kb *Bam*HI–*Bam*HI fragment was subcloned into pUC19 yielding pUC-ARG. An internal *Sna*BI–*Bgl*II fragment (which comprised most of the ARG6 domain) was then replaced with either the *Bam*HI–*Bgl*II fragment of pCUB-6 (Fonzi & Irwin, 1993) (carrying the *hisG*–*URA3*–*hisG* cassette) or the *Kpn*I–*Ssp*I fragment from YEp-HISX (Pla *et al.*, 1995) (carrying the *C. albicans* HIS1

Table 1. Strains used in this work

Organism	Strain	Genotype/phenotype	Origin
<i>C. albicans</i>	1001*	Wild-type	Gil <i>et al.</i> (1988)
<i>C. albicans</i>	SC5314	Wild-type	Gillum <i>et al.</i> (1984)
<i>C. albicans</i>	EL2†	Arg ⁻ Ade ⁻	Gil <i>et al.</i> (1988)
<i>C. albicans</i>	CA14	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	Fonzi & Irwin (1993)
<i>C. albicans</i>	1006	<i>MPA1 ser57 ura3 lys1 arg4‡</i>	
<i>C. albicans</i>	RM1000	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG his1Δ::hisG</i>	Unpublished
<i>C. albicans</i>	CNC40	(RM1000)§ <i>arg5,6Δ::hisG-URA3-hisG/ARG5,6</i>	This work
<i>C. albicans</i>	CNC41	(RM1000)§ <i>arg5,6Δ::hisG/ARG5,6</i>	This work
<i>C. albicans</i>	CNC42	(RM1000)§ <i>arg5,6Δ::hisG/arg5,6Δ::hisG-URA3-hisG</i>	This work
<i>C. albicans</i>	CNC43	(RM1000)§ <i>arg5,6Δ::hisG/arg5,6Δ::hisG</i>	This work
<i>C. albicans</i>	CNC44	(RM1000)§ <i>arg5,6Δ::hisG-URA3-hisG/arg5,6Δ::HIS1</i>	This work
<i>E. coli</i>	MC1061	<i>araD139 Δ(ara-leu)7697Δ (lac)X74 galU galK traA</i>	Navarro-García <i>et al.</i> (1995)
<i>E. coli</i>	DH5αF'	<i>K12 Δ(lacZYA-argF)U169 supE44 thi1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA relA1 (φ80lacZΔM15) F'</i>	Hanahan (1988)

* A wild-type strain from the Colección Española de Cultivos Tipo (Spanish Type Culture Collection), ATCC 64385.

† An Arg⁻ Ade⁻ auxotroph derived from strain 1001.

‡ Designated *arg57* (Goshorn & Scherer, 1989) and later shown to be *arg4* mutant (Hoyer *et al.*, 1994).

§ RM1000 background.

gene) yielding, respectively, pUC-ARG-U and pUC-ARG-H. Homologous integration of these constructs was achieved by transformation using DNA that had been linearized with *ScaI* and *Bam*HI. The genotype of all strains was checked by Southern analysis using a *Cla*I–*Sca*I fragment of *C. albicans* ARG5,6 as a probe and digesting the genomic DNA of the transformants with *Hpa*I–*Cla*I (Fig. 1).

Genetic transformation procedures. *C. albicans* was transformed using the standard protoplast method with minor modifications (Herreros *et al.*, 1992; Pla *et al.*, 1995). Gene disruption of *C. albicans* ARG5,6 by cotransformation of pUC-ARG-U and pUC-ARG-H was optimized with respect to the concentration of both DNAs used in the assay. Protoplast fusions were performed as described previously (Gil *et al.*, 1988). Electroporation was used for the recovery of plasmid DNA from *C. albicans* transformants (Pla *et al.*, 1995).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of the *C. albicans* ARG5,6 gene

Strain EL2 is an arginine and adenine auxotroph obtained through ethylmethane sulfonate mutagenesis of strain 1001 as described previously (Gil *et al.*, 1990). This auxotrophic mutant was used for the generation of a set of *C. albicans* mutants altered in their ability to undergo the dimorphic transition (Gil *et al.*, 1988, 1990). We first verified that the arginine biosynthetic defect present in strains EL2 and 1006 (*arg4*; Hoyer *et al.*, 1994) was different since it was possible to isolate prototrophic

hybrids when parasexual crosses between both strains were carried out. A gene library constructed in the double autonomously replicating sequence vector pRM1 (Pla *et al.*, 1995) was used to isolate the complementing gene. Screening of approximately 50 000 transformants yielded 14 prototrophs after 7 d growth in selective medium. Only one of them was characterized further. Plasmid DNA, designated pAN1, was extracted from this transformant and was shown to be capable of complementing the auxotrophic phenotype upon retransformation. Standard restriction analysis revealed an insert of approximately 7 kb, with a minimal 3.8 kb *Bam*HI–*Bam*HI complementing region (Fig. 1). When present in the episomal plasmid YEpl352 (plasmid YEpl-ARG), this DNA was shown to complement the *arg6* defect present in strain D160-4D (an *arg6* mutant). These results demonstrate the usefulness of these replicative plasmids (Cannon *et al.*, 1992; Pla *et al.*, 1995) in *C. albicans* genetic manipulation.

Sequence analysis of the *C. albicans* ARG5,6 gene

Sequence analysis of the insert revealed a putative ORF of 857 amino acids (95 kDa). This protein was 63% identical to the predicted translation product of the ARG5,6 gene of *S. cerevisiae* (54% identical to *Schizosaccharomyces pombe* Arg5,6p), thus indicating that we had cloned the *C. albicans* ARG5,6 gene. In *S. cerevisiae*, this gene is responsible for the generation of a polypeptide which is post-translationally processed yielding two mature polypeptides that encode the acetylglutamate kinase (ARG6) and acetylglutamate-phosphate reductase (ARG5) activities in the arginine biosynthetic pathway (Boonchird *et al.*, 1991). Thus, in *C. albicans*, the genetic organization of the ARG5,6 locus is apparently similar to that in *S. cerevisiae* (Boonchird *et al.*, 1991) and *Schiz. pombe* (van Huffel *et al.*, 1992) and contrasts with the situation in prokaryotes where each activity is encoded by a separate gene. A putative TATA box was found around position 253 (Fig. 2), while a putative transcription termination signal was at 2943–2967 (based on their homology to *S. cerevisiae* consensus signals). No obvious *S. cerevisiae* GCN boxes (consensus sequence TGACTC) could be found in the 5'-upstream region, as has been observed for the *C. albicans* ARO3 (Pereira & Livi, 1995) and ARG4 (Hoyer *et al.*, 1994) genes. In addition to the *arg4* mutant strains 1006 and TMSU221, another complementation group designated *arg100* has been described for strains A642, hOG318, hOG357, FC18-6 and WC-5-4 (Hoyer *et al.*, 1994) located on the R chromosome. pAN8, an autoreplicative plasmid bearing the ARG5,6 gene, did not complement hOG318 arginine auxotrophy.

Construction of an *arg5,6Δ* null mutant

We used two different strategies to obtain an *arg5,6Δ* mutant in the *ura3Δ his1Δ* strain RM1000 background. We first used the *URA3*-blaster protocol to generate an *arg5,6Δ* mutant. Using the *URA3* marker (construction

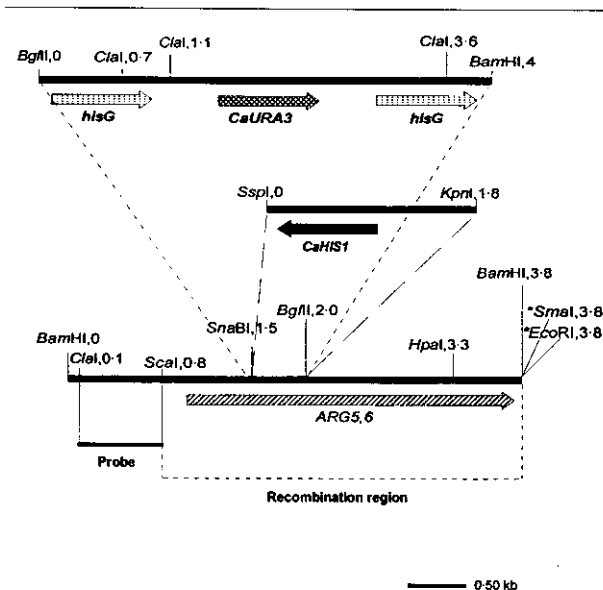


Fig. 1. Physical map of the ARG5,6 locus and its disruption strategy. The *hisG*–*URA3*–*hisG* cassette and the *HIS1* gene were used to replace an internal fragment of the *C. albicans* ARG5,6 gene. Only the relevant restriction sites are shown, with numbers indicating the position in kb. The asterisks indicate restriction sites that are derived from the multiple cloning site of the pUC polylinker and are not found in the genomic DNA. Arrows represent the structural genes. The probe used in Southern blot analysis and the recombination region are indicated (see Methods).

ACTTGAATATTTTTTAAACCATTAGTACTAATTCATATTGCTTTTGGTTTGATAAAAA 60
 AAAAAAGAGGACGCAATTTGGTGAGGTACGTCACATGATCTTACATCGCGTAAAG 120
 AAAATTTTTCAAAAAATAATTACTCTTTTGTATCAAAATTTATATTCAAATTTAATTATTG 180
 CGATAATAATGAAATTTTTTTTAAAAAAGGAGACAAATTTAAAAATGTGAAAAAGAAA 240
 ATTTTTTTTCAATATATATGCGAGTTTCTTCTTCTGCTGGTTTGAACCTTTTTTTT 300
 ATATATTTTGTATGAGTCCCTTATATGCTCTTATATGATGACAGCAAGTGAATAAAAAGG 360
 M I R Q V N K K
 CTATTTCAACAGCTCTTTTCAAAAGATTATCGCTCAGCGGTAGTCTTTTGTCTAATATTA 420
 A I S N S L F K R L S L S G S A F A N I
 CAGCCAATAAAAAATGCTCCACTCATCACTCAACCAAAAGACTCAATTAGCAAAATGTTTC 480
 T A N K K S S T H Q L N Q K T Q L A N V
 GTTCTTATTCACAAAAATCCACTGTTTATTCAGTTATTGAACCAATTTGGTTCCAAACGTG 540
 R F Y S T K S T V I Q L L N N I G S K R
 AAGTTGAACAATACTTTGAAATATTTTCACTTCGGTATCTCAACAACAAATTTGCTGTGATCA 600
 E V E Q Y L K Y F T S V S Q Q Q F A V I
 AAGTTGGTGGTGAATTTATCAACCAAAATTTGAACCAATTTAGCATCATGCTTGGCACTTTT 660
 K V G G A I I T Q Q L N E L A S C L A F
 TGTATCATGTTGGTTTGTACCTTATTTGTATTACATGTTACTGCTCCACAAATCAATGAAT 720
 L Y H V G L Y P I V L H G T G P Q I N E
 TGTGTGAACCAAGAGTGTGTAACCAAGATATATTTGATGGTATCAGAAATCCCAACCCCA 780
 L L E N E G V E P E Y I D G I R I T N P
 AAACAATGGAAGTAGTACGTAAGTGTCTTCTAGAGCAAACTTCCGTTTGGTGACAGCTT 840
 K T M E V V R K C F L E Q N L R L V T A
 TGGAAAAAATTTGGTGTCCACGCTCGTCCAATAAAGTGTGGTGTATTGAAAGTGAATATT 900
 L E K I G V H A R P I T A G V F E A E Y
 TGGATAAGGACAAGTATCAATTAGTTGGTAAATCACTAGTGTCAACAATCCCAAGTTG 960
 L D K D K Y Q L V G K I T S V N K S P V
 AAGCTGCCATCAATAGTGGATGACTTGTGCAATTTTGGCATCTTTGGCCGAAACCTCTCTG 1020
 E A A I N S G Y L P I L T S L A E T S S
 GTCAATTTAATATGTAATGCGGACGTTGCTGCGCGAGAATTAGCTCGTGAATTTGAAC 1080
 G Q L L N V N A D V A A G E L A R E F E
 CTTTGAAAAATTTTACTTTGAATGAAAGGTTGATTTATTAACCGGAACACTGGTGAGA 1140
 P L K I V L I N E K G G I N G N T G E
 AAGTTTCTGCTATCAATTTGGATGAAGAATATGAAGATTGTTTAAAGGAAAGTTGGGTTA 1200
 K V S A I N L D E E Y E D L L K E S W V
 AATATGTTACTAATTTGAAGATCAAGGAAATTCACGATTTTATACAACTTTTGCCAAAGT 1260
 K Y G T K L K I K E I H D L L Q H L P R
 CTCTCTCAGTTGCCATTTATGATGTCAAGATTTTACAAAAGGAATTTGTTCACTGATTTG 1320
 S S S V A I I D V N D L Q K E L F T D S
 GTGCTGTTACTTTAATCAGAAGAGTTACAGATTAAATTAACAGAACTCTTTCGCTGATT 1380
 G A G T L I R R G Y R L I N R N S L R D
 TTGGTAACCCAGACTTTGTTAAGAAACGCACTTTGTAAGAGACCCAGAAATCAAACTGGTA 1440
 F G N P D L L R N A L L R D P E I K T G
 AAGTGTCTGTTGCTTCATCTTGAAGTTTGTGATCTCTGTTCAATTCAGAGTTATGAG 1500
 K V S V A S Y L K F L D S V Q F K S Y G
 ACGAACCCTTTGGAAGTATTTGGCTATTGTTGGTAGAACAATGACAAATTCCTAAATTAG 1560
 D E P L E V L A I V V N D K I P K L
 ACGAGTTTGTGATCCAGACAGGTGGTTAAACAATGTTACCGATAATATTTTCAATG 1620
 D E F L S S K T G W L N N V T D N I F N
 CTATCAAGAAAGATTACAGTCAATTATGTTGGGTGTTAATGAAAAAGATGCCAACTTAC 1680
 A I K K D Y S Q L C W V V N E N D A N L
 CTGTGATTTCTCCAAATCAGATGTTTATTTGCCAAGAAATGGCCAAATCTTGTTTTGGT 1740
 P W Y P S K S D G S F A K N G Q I L F W
 ACGGTTTAAACATTGACGAAGCTAGTAAATTTGATTAAGAATTTTGGATTTTCATCTATTG 1800
 Y G L N I D E A S K L I K E F D S S S I
 GATCATCGTTGTCATCTTCTAAGAATCTGCGGCTATTCACATCTGCTCAACAAAAGCGTG 1860
 G S S L S S S K E S G V F T S A Q Q K R
 GTTTCACCACTCTACAGTTCGTTAGAAACACCAATCTTCTCCTCCATTATCTGAAGGTA 1920
 G F H H S T V R R N T N P N P P L S E G
 AGCAACCGAGAGAAAAAAGTTGCTTTGATTGTGTGCTAGAGGTACACTGGACAAAAT 1980
 K Q T E R K K V A L I G A R G Y T G Q N
 TGATTAATTTGATCGACAACCATCTACTTGGATATTTTCATATGTTGCTGCTCAGTGAAT 2040
 L I K L I D N H P Y L D I S Y V S S R E
 TGAAGGTCAAAAATTTACAAGTTTACAACAGGATAACATTGTTTACTCCAACTTGCAAA 2100
 L E G Q K L Q G Y N K D N I V Y S N L Q
 TTGAAGACATCAAGAGATTAGAAGAAAAATGAGGTGTGATGTTTGGTTTATGCTTTTAC 2160
 I E D I K R L E E N N E V D V W V M A L
 CTATGTTGTTTGTAAACCATTTGTTGACACTATTGATTAGTTTTCAGAACCAATCTCTA 2220
 P N G V C K P F V D T I D L V K N P N S
 AAATTCGATTTTATCTGCTGATTATGTTGTTGACAACTGGTGAATGGACTTATGGAT 2280
 K I V D L S A D Y R F D T T G E W T Y G
 TACCAAGACTAAATGATCGTAAGACCATAGCTCAAGCTAAGAAAAATTTTCAACCCAGGTT 2340
 L P E L N D R K T I A Q A K K I S N P G
 GCTATGCCACTGCTGCTCAAGTGGCCATTTGCCCGTTTAAAGATATATTTCTGGAACCT 2400
 C Y A T A A Q V A I A P L K E Y I S G T
 CAAGCAITTTTGGTGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2460
 P S I F G V S G Y S G A G T K P S P K N
 ACGTCAATTTTATTTGTCAAAATTTTAAATTTCTTACTGTTTAACTGATCATGTACACGAAA 2520
 D V N L L S N N L I P Y S L T D H V H E
 AAGAAATTAGTAGTCAATTTAGGTTTACAAGTTGCTATTTACCCACAGTTGCTCAATGGT 2580
 K E I S S Q L G L Q V A F T P H V A Q W
 TTCAAGGTATTTACTCATATCAACATTTCAATTTAAAAAAGGATCTTTGACTTCTCGTG 2640
 F Q G I T H T I N I P I K K G S L T S R
 AAATAGAAACATTTACCAAGATAGATATCAAGGTGAAAAGCTAATCACCATTAGTGGAG 2700
 E I R N I Y Q D R Y Q G E K L I T I S G
 AAGCACCATTGTTTAAAGACATTTAGTGGCAACACGGTGTGCTGTTGTTGGTGGCTTTGCTG 2760
 E A P L V K D I S G K H G V V V G G F A
 TCACTCTAATGAAGACCGTGTGTTATTTGTTGCCACTATTGACAAATTTGTTGAAGAGTG 2820
 V N S N E D R V V I V A T I D N L L K G
 CAGCTACCAATGTTTACAAAATATAAATTTGAGTCAAGAAATTTGGTGAATACGATGGTA 2880
 A A T Q C L Q N I N L S Q E F G E Y D G
 TTCCAAACCAATCTTGATCAGAGGCTAAACTTGCCACAAAAAGAGTATGAAATTTTTTTA 2940
 I P T E S L I R G -
 GATAGTTTATTTATTTGTTTATTTTCTCTATAGTTATATAAATAGACTTTATATACAA 3000
 TCATATACACTGTTTGTATTAGATTAGTTTGTATTTCTTCCCTTTATATATACITCT 3060
 AATATTTTATAGCCAATTA GATCC

Fig. 2. Nucleotide sequence of a *Scal*-*Bam*HI fragment encoding *C. albicans* ARG5,6 with its deduced amino acid translation. The presumed TATA box region (underlined) and the putative transcription termination signal (double underlined) are shown. *Scal* and *Bam*HI sites are highlighted in bold.

pUC-ARG-U), a clone was selected which was shown by Southern blotting to integrate the *URA3*-blaster construction at the ARG5,6 locus, yielding the heterozygous strain CNC40. Excision of *URA3* was achieved on 5-fluoroorotic acid plates, yielding strain CNC41. Strain CNC42 (homozygous *arg5,6Δ* strain) was obtained through a second round of transformation which allowed us to obtain arginine auxotrophs at a frequency of 15%. Finally, excision of *URA3* on 5-fluoroorotic

acid plates yielded strain CNC43 (*ura3Δ his1Δ arg5,6Δ*). In an alternative approach, the *C. albicans* *HIS1* gene (Pla *et al.*, 1995) was used to replace an internal region of *C. albicans* ARG5,6. Strain CNC40 was transformed with pUC-ARG-H making use of *HIS1* (see Methods) as a selectable marker (Fig. 1). Fifteen of 21 Ura⁺ His⁺ transformants (70%) were shown to be arginine auxotrophs. This strain was efficiently transformed to arginine prototrophy with plasmid pAN8 (see Methods).

The availability of an appropriate genetic marker, the *C. albicans* ARG5,6 gene, allowed us to check the feasibility of a single-step gene disruption in *C. albicans*. We cotransformed strain RM1000 (*his1Δ ura3Δ*) with both URA- and HIS-blaster constructions. A cotransformation frequency of approximately 10% was found, similar to that quoted by other authors (Kurtz *et al.*, 1986, 1990). Ten per cent of the prototrophic clones were shown to be arginine auxotrophs (strain CNC44) carrying the correct (i.e. homologous) recombination event at the ARG5,6 locus. This result is in general agreement with estimated frequencies for single recombination events (70% and 15%).

We conclude that it is possible to generate a deletion in a specific *C. albicans* gene in a single transformation step. This should expedite the generation of homozygous null mutants by integrative transformation by reducing substantially the number of steps required to achieve the disruption of the two alleles at each genetic locus. Strains with different gene markers (like the *ura3Δ his1Δ arg5,6Δ* strain described in this work) and suitable for genetic transformation should allow the deletion of both alleles of a specific gene while maintaining the wild-type gene on an episomal plasmid.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R. M. Pérez Díaz for her excellent technical assistance, F. Navarro-García for critical reading of the manuscript, M. L. Hernández for helpful scientific comments and M. García Sáez for the expert sequencing technical work (Servicio de Secuenciación Automatizada de DNA de la Universidad Complutense). This investigation was supported by the grant FIS93/0183 from Fondo de Investigaciones Sanitarias. L. Monteoliva is the recipient of a fellowship from the Universidad Complutense de Madrid.

REFERENCES

- Boonchird, C., Messenguy, F. & Dubois, E. (1991). Characterization of the yeast ARG5,6 gene: determination of the nucleotide sequence, analysis of the control region and of ARG5,6 transcript. *Mol Gen Genet* 226, 154–166.
- Cannon, R. D., Jenkinson, H. F. & Shepherd, M. G. (1990). Isolation and nucleotide sequence of an autonomously replicating sequence (ARS) element functional in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 221, 210–218.
- Cannon, R. D., Jenkinson, H. F. & Shepherd, M. G. (1992). Cloning and expression of *Candida albicans* ADE2 and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 235, 453–457.
- Fonzi, W. A. & Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717–728.
- Gil, C., Pomés, R. & Nombela, C. (1988). A complementation analysis by parasexual recombination of *Candida albicans* morphological mutants. *J Gen Microbiol* 134, 1587–1595.
- Gil, C., Pomés, R. & Nombela, C. (1990). Isolation and characterization of *Candida albicans* morphological mutants derepressed for the formation of filamentous hypha-type structures. *J Bacteriol* 172, 2384–2391.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. H. & Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198, 179–182.
- Gorman, J. A., Chan, W. & Gorman, J. W. (1991). Repeated use of GAL1 for gene disruption in *Candida albicans*. *Genetics* 129, 19–24.
- Goshorn, A. K. & Scherer, S. (1989). Genetic analysis of prototrophic natural variants of *Candida albicans*. *Genetics* 123, 667–673.
- Goshorn, A. K., Grindle, S. M. & Scherer, S. (1992). Gene isolation by complementation in *Candida albicans* and applications to physical and genetic mapping. *Infect Immun* 60, 876–884.
- Hanahan, D. (1988). Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning*, pp. 109–135. Edited by D. M. Glover. Oxford: IRL Press.
- Herreros, E., García-Sáez, M. I., Nombela, C. & Sánchez, M. (1992). A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation. *Mol Microbiol* 6, 3567–3574.
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. & Tzagoloff, A. (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2, 163–167.
- Hoyer, L. L., Magee, B. B., Rikkerink, E. H. & Scherer, S. (1994). The ARG4 gene of *Candida albicans*. *Gene* 2, 213–218.
- van Huffel, C., Dubois, E. & Messenguy, F. (1992). Cloning and sequencing of *arg3* and *arg11* genes of *Schizosaccharomyces pombe* on a 10-kb DNA fragment. Heterologous expression and mitochondrial targeting of their translation products. *Eur J Biochem* 205, 33–43.
- Kelly, R., Miller, S. M., Kurtz, M. B. & Kirsch, D. R. (1987). Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one-step gene disruption to isolate *ura3* mutants. *Mol Cell Biol* 7, 199–208.
- Kurtz, M. B., Cortelyou, M. W. & Kirsch, D. R. (1986). Integrative transformation of *Candida albicans* using a cloned *Candida ADE2* gene. *Mol Cell Biol* 6, 142–149.
- Kurtz, M. B., Cortelyou, M. W., Miller, S. M., Lai, M. & Kirsch, D. R. (1987). Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 7, 209–217.
- Kurtz, M. B., Kelly, R. & Kirsch, D. R. (1990). Molecular genetics of *Candida albicans*. In *The Genetics of Candida*, pp. 21–74. Edited by D. R. Kirsch, R. Kelly & M. B. Kurtz. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Navarro-García, F., Sánchez, M., Pla, J. & Nombela, C. (1995). Functional characterization of the MKC1 gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol* 4, 2197–2206.
- Odds, F. C. (1988). *Candida and Candidosis*, 2nd edn. London: Baillière Tindall.
- Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2444–2448.
- Pereira, S. A. & Livi, G. P. (1995). A GCN-like response in *Candida albicans*. *Cell Biol Int* 19, 65–69.
- Pla, J., Pérez-Díaz, R. M., Navarro-García, F., Sánchez, M. & Nombela, C. (1995). Cloning of *Candida albicans* HIS1 gene by direct homologous complementation of a histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector. *Gene* 165, 115–120.
- Rosenbluh, A., Mevarech, M., Koltin, Y. & Gorman, J. A. (1985). Isolation of genes from *Candida albicans* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 200, 500–502.
- Sadhu, C., Hoekstra, D., McEachern, M. J., Reed, S. I. & Hicks, J. B.

(1992). A G-protein alpha subunit from asexual *Candida albicans* functions in the mating signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by the a1-alpha 2 repressor. *Mol Cell Biol* 12, 1977–1985.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing

with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463–5467.

Scherer, S. & Magee, P. T. (1990). Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 54, 226–241.

Received 1 July 1996; revised 27 September 1996; accepted 8 October 1996.



Informe del Consejo de Departamento de Microbiología II sobre Tesis Doctoral de Lucía Monteoliva Díaz.

Título: "Clonación y caracterización de *CaSEC14*, un gen implicado en la ruta de secreción de proteínas en *Candida albicans*".

Doctorando: Lucía Monteoliva Díaz.

Directores: César Nombela y Concha Gil.

Lugar de realización: Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia. UCM.

Fecha: 30 Junio 1997.

Calificación: Apto *cum laude* por unanimidad.

Los aspectos destacables de esta Tesis son los siguientes:

a) Originalidad del trabajo:

El trabajo que presenta la Dra L. Monteoliva es de **gran originalidad en el campo científico de la biología molecular de hongos patógenos**. Las infecciones producidas por hongos han experimentado un considerable aumento durante los últimos años debido a varios factores como son la aparición del SIDA, la extensión del cáncer y el aumento de personas inmunodeprimidas. Una de las especies que se aísla con más frecuencia en las infecciones fúngicas es el **hongo dimórfico *Candida albicans*** que se ha utilizado como modelo en este trabajo. El número de antifúngicos disponibles es muy pequeño y presentan problemas de toxicidad y/o de aparición de cepas resistentes. Es por tanto necesario **buscar nuevas dianas en la célula fúngica que permitan el descubrimiento y desarrollo de nuevos y muy selectivos agentes antifúngicos**.

El trabajo de la doctoranda se basó en el **descubrimiento, aislamiento y caracterización de una diana esencial en la célula fúngica que puede permitir el descubrimiento y desarrollo de nuevos antifúngicos**. El trabajo consistió básicamente en:

1.- Clonación, caracterización y análisis funcional de un gen *C. albicans* homólogo al gen *SEC14* de *Saccharomyces cerevisiae*. Dicho gen codifica una proteína (Sec14p) implicada en la ruta de secreción de proteínas.

2.- Demostración de la esencialidad de dicha proteína para el crecimiento de la célula fúngica, aspecto muy importante para ser una buena diana de agentes antifúngicos.

3.- Estudio de las proteínas humanas homólogas funcionales de Sec14p. Demostración de la capacidad de dichas proteínas humanas de complementar mutantes con el gen *SEC14* delecionado, a pesar de no presentar homología a nivel de secuencia con Sec14p. Esta falta de homología estructural hace de Sec14p una **diana muy prometedora**, capaz de ser inhibida por agentes antifúngicos con gran selectividad sin afectar a la célula humana.

4.- Diseño de sistemas "in vivo" de búsqueda de fármacos antifúngicos que inhiban a la diana propuesta con la selectividad adecuada.

De este trabajo es importante resaltar que la proteína Sec14p es la **única diana propuesta hasta el momento de la gran cantidad de proteínas que intervienen en un proceso tan complejo como es la secreción de proteínas**. Además al no presentar homología estructural con las proteínas humanas que realizan la misma función representa un descubrimiento muy importante para ser utilizado por la industria farmacéutica.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 84

Journal of Management Studies, 19(1), 67-80.

... ..

b) Relevancia científica.

Este trabajo ha dado lugar a varias publicaciones en Revistas de gran relevancia internacional en el campo de la Microbiología y de la Biología Molecular como son *Yeast* (2 publicaciones) y *Microbiology* (1 publicación) así como a una publicación en la *Revista Española de Microbiología*.

Monteoliva L., Sánchez M., Pla J., Gil C. and Nombela C. Cloning of *Candida albicans* SEC14 gene homologue coding for a putative essential function. *Yeast* 12, 1097-1105. 1996.

Pla J., Gil C., Monteoliva L., Navarro-García F., Sánchez M. and Nombela C. Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast* 12, 1677-1702. 1996.

Negredo, A., Monteoliva L., Gil C., Pla J. and Nombela C. Cloning, analysis and one-step disruption of the ARG5,6 gene of *Candida albicans*. *Microbiology* 143, 297-302. 1997.

Molero, G., Díez-Orejales, R., Navarro-García, F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sánchez-Pérez, M and Nombela, C. *Microbiología*. 1998 (en prensa).

Además este trabajo se ha presentado en Congresos Nacionales e Internacionales:

L. Monteoliva, C. Vieira, M. Sánchez, J. Pla, C. Gil y C. Nombela. Clonación y caracterización del gen SEC14 de *Candida albicans*. XV Congreso Nacional de Microbiología. Madrid. 25-28 Septiembre, 1995.

L. Monteoliva, M.L. Hernández, M. Sánchez, J. Pla, C. Gil and C. Nombela. Isolation and characterization of *Candida albicans* SEC14 gene. Seventeenth International Conference on Yeasts Genetics and Molecular Biology. Lisboa, Portugal. 10-16 Junio, 1995.

L. Monteoliva, F. Navarro-García, A. Negredo, M. Sánchez, J. Pla, C. Gil and C. Nombela. Protein secretion as a potential antifungal target. ASM Conference on *Candida* and Candidiasis: Biology, Pathogenesis, and Management. San Diego, California. 24-27 Marzo, 1996.

c) Utilización de la metodología adecuada.

En este trabajo se han utilizado las técnicas más actuales de manipulación de DNA y de proteínas. Clonación y secuenciación, hibridación de ácidos nucleicos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis informatizado de secuencias, mutagénesis dirigida, electroforesis de campo pulsante y Western blot. Ninguna de las técnicas empleadas resultó ser inadecuada para el estudio planteado, obteniéndose siempre resultados valorables. Por lo tanto, se ha combinado la actualización con la economía de medios.

d) Actualización bibliográfica.

La Tesis incluye una revisión bibliográfica perfectamente actualizada. El estudio de la secreción de proteínas ha sido iniciado y desarrollado por la doctoranda con el esfuerzo que supone el abrir una nueva línea de trabajo.

Además la doctoranda ha realizado un gran esfuerzo en el estudio de la secreción de proteínas, proceso muy complejo y de gran actualidad, ya que continuamente están realizándose nuevos descubrimientos.

En resumen, creemos que la Tesis de la Dra L. Monteoliva acredita una excelente calidad y consideramos su rendimiento y el trabajo desarrollado en el Departamento de Microbiología como muy satisfactorio. Por ello, nuestro Departamento considera a la Dra L. Monteoliva una excelente candidata para que le sea concedido el Premio Extraordinario de Doctorado.

Madrid, 16 Marzo 1998.



Dr. R. Rotger Anglada
Director del Departamento





Dra. M. Molina Martín
Secretaria del Departamento

11